

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年11月11日 (11.11.2004)

PCT

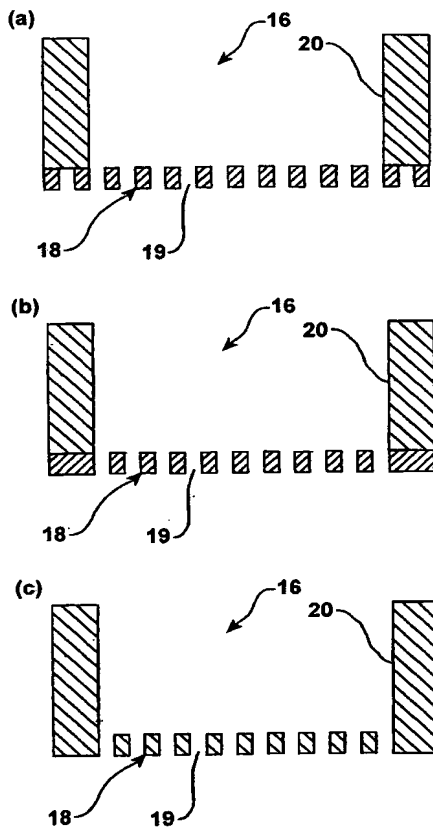
(10) 国際公開番号
WO 2004/097415 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, 37/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005878
- (22) 国際出願日: 2004年4月23日 (23.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-122514 2003年4月25日 (25.04.2003) JP
特願2003-363623 2003年10月23日 (23.10.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): JSR株式会社 (JSR CORPORATION) [JP/JP]; 〒1048410 東京都中央区築地五丁目6番10号 Tokyo (JP). 株式会社オクテック (OCTEC INC.) [JP/JP]; 〒1600011 東京都新宿区若葉1丁目22番地1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 奥村 勝弥 (OKUMURA, Katsuya) [JP/JP]; 〒1600011 東京都新宿区若葉1丁目22番地1 株式会社オクテック内 Tokyo (JP). 三原 誠 (MIHARA, Makoto) [JP/JP]; 〒1048410 東京都中央区築地五丁目6番10号 JSR株式会社内 Tokyo (JP). 吉岡 睦彦 (YOSHIOKA, Mutsuhiko) [JP/JP]; 〒1048410 東京都中央区築地五丁目6番10号 JSR株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 鈴木 俊一郎 (SUZUKI, Shunichiro); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目13番6号 五反田山崎ビル6階 鈴木国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[続葉有]

(54) Title: BIOCHIP AND BIOCHIP KIT, AND METHOD OF PRODUCING THE SAME AND METHOD OF USING THE SAME

(54) 発明の名称: バイオチップおよびバイオチップキットならびにその製造方法および使用方法



(57) Abstract: A biochip and a biochip kit, wherein a target substance in a subject reacts with a probe highly efficiently in a short time and quantitative detection is made possible with high B/F separation efficiency and with high sensitivity; a method of producing the same; a method of reaction between a target substance in a subject and a probe, using the biochip kit; a method of separation and demarcation of a target substance in a subject; and a detection and identification method. The biochip of the invention has a well provided with a filter in which fine straight holes having a uniform diameter are formed at uniform intervals. In this well is received a dispersion liquid having probe carrier particles dispersed therein, and a subject is put in the well to be reacted with the probe carrier particles. A solution such as a subject solution can be introduced into the well through the filter or discharged from the well.

(57) 要約: 高効率に短時間で被検体中の標的物質とプローブが反応し、B/F分離効率が高く、高感度での定量検出が可能であるバイオチップおよびバイオチップキットならびにその製造方法、当該バイオチップキットを用いた、被検体中の標的物質とプローブとの反応方法、被検体中の標的物質の分離分画方法および検出・同定方法等を提供する。本発明のバイオチップは、均一な孔径を有するストレートな細孔が均一な孔間隔で形成されたフィルターが設けられたウェルを備えている。このウェルに、プローブ担持粒子が分散された分散液が収容され、ウェルへ被検体を投入してプローブ担持粒子と反応させる。被検体溶液などの溶液は、フィルターを通してウェルへ導入し、あるいはウェルから排出させることができる。



ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

バイオチップおよびバイオチップキットならびにその製造方法および使用方法

5

技術分野

本発明は、均一な孔径を有するストレートな細孔からなるフィルターが底部に設けられたウェルを備えるバイオチップ、および該バイオチップと容器からなるバイオチップキット、プローブ担持粒子と相互作用する被検

10 体物質中の標的物質とプローブとの反応もしくは相互作用方法、被検体から標的物質をB/F分離する方法、標的物質を被検体から分離分画する方法、および被検物質中の標的物質とバイオプローブとの反応相互作用の検出・同定方法に関する。

15 背景技術

二本鎖DNAは、例えば加熱により一本鎖DNAとした場合でも、これらの構造が相補的であるため相互に結合するという性質を有し、この性質を利用して、ノーザンハイブリダイゼーション法が確立された。そして、従来、適当な長さの特定の配列を有するDNAを制限酵素などでフラグメント化したもの、あるいは合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして

20 使用し、これらと相補的な配列を有するDNAフラグメントやオリゴヌクレオチド等を検索することが標準的な手法として行われてきた。

しかしながら、ノーザンハイブリダイゼーション法は、操作が煩雑であり、少数の被検体を処理する場合であっても、短時間にこれらを処理する

2

ことができないという問題点があった。このため、ノーザンハイブリダイゼーション法を応用した簡便な処理方法として、スライドガラス等の基板上に上記のようなオリゴヌクレオチド等を高密度に固定化し、短時間で分析を行うことができるDNAチップが開発され、現在、汎用に使

5 いる。

このDNAチップの代表的な例として、シリコン等の平面基板上にオリゴヌクレオチドが固定されたものがある。このチップは、基板上に1塩基を固定した後、この塩基と他の塩基とを1塩基ずつ結合させて、20～30塩基程度の長さまで伸張させて作成することができ、光照射下または酸

10 の存在下で所定の塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを直接チップ上で合成してDNAチップを製造することができる。例えば特開昭63-27000号公報には、シリコン等の基板上にオリゴヌクレオチド等を In Situ 合成したDNAチップが記載されている。

あるいは、cDNAあるいは予め合成しておいた適当な長さのオリゴヌクレオチド等の核酸を基板上に結合させて作成することができ、この方法

15 では、別途用意した核酸を粒子担体から分離し、これをスポッターにより所定位置にスポットする、いわゆるブラウン法が用いられる。

しかし、前者の方法では、塩基配列をチップ上で合成するため、一部の塩基配列で合成ミスが生じると、そのチップ全体が不良品となってしまう。

20 この結果、チップの歩留まりは y^{4np} となる。ここで、 y は1回の塩基合成工程における正合成確率、 n は塩基数、 p はプローブ数である。したがって、プローブ数が増えると歩留まりが幾何級数に低下することになる。そこで、予備のプローブを設けて不良プローブの代替プローブを設けることが行われているが、基板面積が大きくなる。

一方、後者の方法では、DNAのスポット量とスポット位置は、スポットターの精度などに大きく依存し、良好な再現性を得ることが難しい。

また、これらのマイクロアレーあるいはDNAチップでは1被検体について数万項目の核酸等のプローブが搭載可能であり、数万項目の同時他項目検査が可能である一方、プローブは基板に固定されており、被検体とプローブとの反応は固定されたプローブと液体中の被検体との反応、いわゆる固液反応と称される反応となる。一般に固液反応は反応効率が悪く、被検体とのいわゆるハイブリダイズ反応は数時間を要する。

また、目的とする塩基配列を有する核酸を精度良く検出するためには、
10 狭いスペースに効率よく、この核酸と相補的な配列を有する核酸（以下、「プローブ」ともいう。）を固定する必要がある。このようなプローブを基板上に固定できる数は、個々のプローブの占有面積とDNAチップ自体の大きさから定まり、一定数以上を固定することは物理的に不可能である。そして、現在使用されているDNAチップのような、被検体に浸漬して反応させるスタイルのチップでは、使用可能な被検体溶液の量が非常に少ない場合もあることから、チップ自体は小さい方がよい。

しかし、チップの大きさを小さくしていくと、プローブを固定できる面積が小さくなることから、狭いスペースのために検出信号が弱くなり、検出感度が低下する。

20 こうした点を改良すべく、最近では、三次元ゲル上に上記のようなプローブを固定したチップが製造され、市販されている（例えば、Analytical Clinica Acta 第444巻 p. 69-78（2001年）を参照）。これらのチップでは、プローブが三次元ゲル上に三次元的に固定され、プローブ密度が高いために検出信号の強度は高くなるが、ノイズの信号強度も高

くなるためにS/N比が上がらず、検出精度の大幅な改善は難しい。ここでノイズの信号強度が上がってしまう要因としては、三次元ゲル上に固定されたプローブと被検体との非特異的反応によって形成された生成物の除去が難しいことが考えられる。

- 5 一方、中空糸を束ねて、これらの中空糸の内面側壁にプローブを結合させて三次元化プローブを形成し、これによりプローブ密度を向上させたチップも開発されている（特開2000-181074号公報を参照）。

- また、垂直異方性の細孔を有する多孔質アルミナ基板を用い、この垂直な孔の内壁にプローブを固定して三次元構造とすることでプローブ密度を
10 上げ、さらに孔が垂直に空いたフローダウン構造を利用して、被検体とプローブとを反応させた後に非標的物質を洗浄除去することが可能なバイオチップも近年開発されている（特表平9-504864号公報（国際公開第01/12846号公報）を参照）。

- このようにプローブを中空糸の内面側壁あるいは多孔質アルミナの細孔
15 内壁と結合する上記したいずれの方法においても、プローブは固定壁に固定されているために、被検体とプローブとが反応する際には、被検体が固定されたプローブへ近接あるいは接触する必要がある。しかしながら、このプローブの大きさは、反応空間容積と比較すれば極めて微小であり、反応空間のスケールで見れば、プローブは固定壁からわずかに突起として飛
20 び出しているに過ぎず、被検体がプローブに近接あるいは接触する確率は極めて低い。したがって、これらの方法では反応のために長時間の攪拌を必要とする。

また、このように三次元構造の内壁にプローブを固定化した場合、孔の深さを深くすると、穴内部側壁の表面張力が大きくなり検体や洗浄液など

の入排出が困難となる。

上記のように固定壁へプローブを固定する代わりに、粒子へプローブを担持して、このプローブ担持粒子を含む溶液中で、プローブ担持粒子と被検体中の標的物質とを反応させる方法も行われている。この方法は、プローブ担持粒子が溶液中に三次元的に分散していることと、プローブ担持粒子と被検体とが相互に移動することができることから、反応性が非常に高いというメリットがある。例えば、ラテックス粒子表面のプローブに被検体中の標的物質を特異的に反応させ、何らかの B/F (Bound form / Free form) 分離によって、特異的にプローブに反応結合した標的物質の内容を解析する検出・同定方法が知られている。

Nucleic Acid Research 第 14 巻 p. 5037-5048 (1986 年) には、被検体である標的核酸と、粒子に担持された核酸プローブとを溶液中でハイブリダイズさせた後、遠心分離して未反応の被検体を除去する方法が記載されており、この方法は現在でも広く使用されている。しかしながら、このように遠心分離を用いると、分離に時間を要し、また分離性能がそれほど高くないという問題点がある。

特開昭 63-27000 号公報、特許第 2975603 号公報には、プローブを担持する粒子として磁性の粒子を使用し、磁石によりこの磁性粒子を固定して、未反応の被検体を洗浄除去する方法が記載されている。この方法も現在広く使用されている。しかし、磁性粒子は一般に磁気特性を発揮するためには 1 ミクロン以上の大きさが必要であり、フェライト等の金属磁性成分を含有するため比重が大きく、沈降や凝集し易く保存性や操作性に注意が必要である。

特開昭 63-27000 号公報には、被検体である標的核酸と、粒子に

- 担持された核酸プローブとを溶液中でハイブリダイズさせた後、濾紙で濾過洗浄を行い、濾紙上に濃縮された反応由来の信号を測定する方法が記載されており、この方法も広く使用されている。しかし、この方法では粒子として用いるラテックス粒子の量が非常に多く、濾過に時間を要するとともに、濾紙が目詰まりし易い。

また、これらの文献に記載された、プローブ担持粒子を使用するいずれの方法においても、1種類の被検体に対して、複数のプローブによる多項目同時検査 (Multiplex Assay) あるいは多項目同時分離分画を行うことができない。

- 10 プローブ担持粒子を使用して多項目同時検査を行う方法として、複数のプローブを識別する何らかの識別ラベルを付けた粒子を用いる方法が提案されている。例えば米国特許第5, 736, 330号公報、特開昭62-81566号公報、特公平7-54324号公報には、蛍光着色した複数の粒子あるいは粒子径の異なる複数の粒子を用い、粒子毎に異なるプローブを担持させ、色や粒子径等でプローブの種類を特定し、被検体とプローブ担持粒子との反応をフローサイトメーターで検出する方法が記載されており、この方法も現在広く用いられている。

- しかし、この方法では被検体と反応させたプローブ担持粒子をフィルター付き96孔プレートで濾過するか、あるいは遠心分離等の方法でB/F
20 分離した後に、フローサイトメーターに分注して検出している。この場合、被検体は一度フィルター付きプレートや遠心分離用遠沈管で処理されその後フローサイトメーターに掛けられるために、工程が増えるとともに、プレートや管による汚染や被検体の付着による減損の可能性がある。

また、色で識別する方法では、識別し得る色の種類に限度があり、一定

の波長範囲と光強度の組み合わせで分光できる光は約100種類であり、したがって、約100種類の色と強度の組み合わせ、すなわち100種類のプローブの同時検査が限度といわれている。

この他、特開平11-243997号公報には、粒子サイズとその形状
5 により粒子を識別する方法が記載されている。また、特開2000-346842号公報には、粒子を一次元あるいは二次元に配列し、種類の異なるプローブ粒子を区分するために、サイズの異なる微粒子を分離隔壁として用いる方法が記載されている。

上記した各文献に記載された、粒子を識別して多項目同時検査を行うい
10 ずれの方法においても、粒子の識別のためにフローサイトメーターによる検出が行われている。しかしながら、このフローサイトメーターによる方法では、粒子を細管中に流し、この細管の透明部分からレーザーを照射して粒子をシーケンシャルに識別するために、検出時間が掛かるという問題点がある。また、検出時間を短縮するためには1個の粒子識別に時間が
15 掛けられず、検出精度が低下する可能性がある。また、フローサイトメーターの細管は高価であり、被検体を替えるごとに細管を取り替えることはコスト的に困難である。このため、被検体を替えるごとに細管を洗浄する必要があり、洗浄を充分に行うためにはさらに時間を要する。

バイオチップには、そのプローブとしてDNAフラグメントまたはオリ
20 ゴヌクレオチドを固定したDNAチップの他、抗原および抗体等のタンパクあるいはこれらのタンパクと特異的に反応するあるいは相互作用する化学物質を固定したプロテインチップ等があるが、上述してきた各問題点は、これらのプロテインチップ等においても同様に存在する。

これらのDNAチップ、およびプロテインチップは、基板上に固定する

各種のプロープによって、生物の持つ遺伝子の機能解析；各種感染症等の疾病の罹患状況を確認するための臨床検査；遺伝子多型解析；テーラーメイド治療と称される、患者の遺伝子配列に応じた治療医薬の選定；医薬品開発のための化学物質あるいはたん白のスクリーニングあるいは化学物質の、毒性スクリーニング；その他の各種スクリーニング等に応用することができる。

しかしながら、こうした各種の用途に応用するためには、現在使用されているバイオチップでは検出感度が充分ではない。例えば、病気を極く初期で発見するためには、病気の極く初期の段階において細胞から細胞外に出てくる、極めて微量である病気由来のマーカーを検出する必要があるが、現状のバイオチップによる検出感度では、この極微量のマーカーを検出するためには不十分であるといわれており、より高感度のバイオチップが必要とされている。

また、患者の病気の状態に関する正確な情報を得て、診断誤差を最小限にするためには、単一のプロープでは不十分であり、複数の異なるプロープによる多項目同時検査が望ましい。したがって、高い検出感度で多項目同時検査を行うことができるバイオチップが要望されている。

本発明は、上記した従来技術の問題点を解決するために為されたものであり、その目的は、

- 20 ・ 高効率に短時間で被検体中の標的物質とプロープが反応し、
- ・ B/F 分離効率が高く、・ 高感度での検出・ 同定が可能であるバイオチップおよびその製造方法を提供することにある。

また、本発明の目的は、複数のウェルからなるバイオチップ同士、あるいは複数のウェルからなるバイオチップと複数のウェルからなる容器との

間で、直接ウエル間で液体の授受を行うことが可能であるバイオチップキットを提供することにある。

さらに、本発明の目的は、

- ・当該バイオチップを用いた、一被検体からの少なくとも一種類以上の標

5 標的物質の分離分画方法

- ・多数の被検体から同時並行に少なくとも一種類以上の標的物質を分離分画する方法

- ・一被検体からの少なくとも一種類以上の標的物質のアッセイ方法

- ・多数の被検体からの同時並行に行う少なくとも一種類以上の標的物質の

10 アッセイ方法を提供することにある。

発明の開示

(i) 本発明のバイオチップは、均一な孔径を有するストレートな細孔が均一な孔間隔で形成されたフィルターが底部に設けられたウエルを備える

15 ことを特徴としている。

(ii) 本発明のバイオチップは、(i)のバイオチップにおいて、前記フィルターの厚さが $1 \sim 10 \mu\text{m}$ であることを特徴としている。

(iii) 本発明のバイオチップは、(i)または(ii)のバイオチップにおいて、前記フィルターの開口率が $15 \sim 60\%$ であることを特徴としている。

20 (iv) 本発明のバイオチップは、(i)～(iii)のいずれかのバイオチップにおいて、前記フィルターの表面材質がシリカ、チタニアまたはアルミナであることを特徴としている。

(v) 本発明のバイオチップは、(i)～(iv)のいずれかのバイオチップにおいて、一体に形成された複数の前記ウエルを備えることを特徴としている。

(vi) 本発明のバイオチップは、(i)～(iv)のいずれかのバイオチップにおいて、単数の前記ウエルを備えることを特徴としている。

(vii) 本発明のバイオチップは、(i)～(vi)のいずれかのバイオチップにおいて、前記ウエルにおけるフィルターの上面側または下面側に補強用リブ部が設けられていることを特徴としている。

(viii) 本発明のバイオチップは、(vii)のバイオチップにおいて、前記補強用リブ部が、複数の貫通孔が形成された一体形状であることを特徴としている。

(xi) 本発明のバイオチップは、(vii)または(viii)のバイオチップにおいて、前記補強用リブ部が、前記フィルターと直接に接合されていることを特徴としている。

(x) 本発明のバイオチップは、(vii)または(viii)のバイオチップにおいて、前記補強用リブ部が、前記フィルターと同一材料で連続形成されていることを特徴としている。

(xi) 本発明のバイオチップは、(i)～(x)のいずれかのバイオチップにおいて、前記ウエルの底部に、その周縁から所定の幅で、フィルターの細孔が形成されていない無孔部が設けられていることを特徴としている。

(xii) 本発明のバイオチップは、(i)～(xi)のいずれかのバイオチップにおいて、第一のフィルターが底部に設けられるとともに、ウエルを挟んで第一のフィルターとは反対側に第二のフィルターが設けられていることを特徴としている。

(xiii) 本発明のバイオチップは、(i)～(xii)のいずれかのバイオチップにおいて、前記ウエルに、プローブ担持粒子が分散された分散液が收容されていることを特徴としている。

(xiv) 本発明のバイオチップは前記粒子の粒子径とフィルターの孔径との比率が、 $\text{粒子径} / \text{孔径} = 1.1 \sim 2.5$ であり、且つ $\text{粒子径} < \text{孔間隔} < \text{粒子径} \times 10$ であることを特徴としている。

(xv) 本発明のバイオチップは前記粒子の粒子径、フィルターの孔径および孔間隔が、 $\text{粒子径} > \text{孔径} + \text{孔間隔} / 2$ の関係を満足することを特徴としている。

(xvi) 本発明のバイオチップは、(xiii)のバイオチップにおいて、前記ウエルに、プローブ識別情報を与えるための少なくとも一種の識別手段を有するプローブ担持粒子が分散された分散液が収容されていることを特徴
10 としている。

(xvii) 本発明のバイオチップは、(xvi)のバイオチップにおいて、前記識別手段が、プローブ担持粒子の色、形状、粒子径および遺伝子配列から選ばれる少なくとも一種であることを特徴としている。

(xviii) 本発明のバイオチップは、(xvi)または(xvii)のバイオチップに
15 において、全ての前記識別手段におけるプローブ識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、前記プローブ識別情報が同一であることを特徴としている。

(xix) 本発明のバイオチップは、(xvi)または(xvii)のバイオチップにお
20 いて、全ての前記識別手段におけるプローブ識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、前記プローブ識別情報が異なっていることを特徴としている。

(xx) 本発明のバイオチップは、(xvi)または(xvii)のバイオチップにお

いて、少なくとも一種の前記識別手段におけるプローブ識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、その全ての識別手段における前記プローブ識別情報の構成が同一であることを特徴としている。

- 5 (xxi) 本発明のバイオチップは、(xvi)または(xvii)のバイオチップにおいて、少なくとも一種の前記識別手段におけるプローブ識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、その少なくとも一種の前記識別手段における前記プローブ識別情報の構成が異なっていること
- 10 を特徴としている。

(xxii) 本発明のバイオチップキットは、(i)～(xxi)のいずれかのバイオチップにおける一体に形成された複数のウエルもしくは単数のウエルを収納するか、あるいは当該ウエルと接続される容器を備えることを特徴としている。

- 15 (xxiii) 本発明のバイオチップキットは、(xxii)のバイオチップキットにおいて、前記容器が、前記ウエルと一体に形成されていることを特徴としている。

- (xxiv) 本発明のバイオチップキットは、(xxii)のバイオチップキットにおいて、前記容器が、前記ウエルと独立に形成されていることを特徴とし
- 20 ている。

(xxv) 本発明のバイオチップキットは、(xxii)～(xxiv)のいずれかのバイオチップキットにおいて、前記容器が、前記バイオチップのウエルに対応するウエルを有することを特徴としている。

(xxvi) 本発明のバイオチップキットは、(xxv)のバイオチップキットに

において、前記容器のウエル底部に貫通穴が形成されていることを特徴としている。

(xxvii) 本発明のバイオチップキットは、(xxv)または(xxvi)のバイオチップキットにおいて、前記バイオチップと前記容器とが、対応するウエル
5 が互いに連結するように接続されていることを特徴としている。

(xxviii) 本発明のバイオチップキットは、(xxii)～(xxvii)のバイオチップキットにおいて、前記容器が、貫通穴が形成されたプレートと、貫通穴が形成されていないプレートの少なくともいずれかを用いて、複数の前記プレートを積層することにより形成されていることを特徴としている。

10 (xxix) 本発明のバイオチップキットは、(i)～(xxi)のいずれかの複数のバイオチップ同士が、対応するウエルが互いに連結するように接続されていることを特徴としている。

(xxx) 本発明のバイオチップキットは、(xxii)～(xxix)のいずれかのバイオチップキットにおいて、前記バイオチップのウエル側部の下端に設け
15 られた平坦部と、別途の前記容器または前記バイオチップのウエル側部の上端に設けられた平坦部とが、ウエルを互いに連結するように直接に接続されていることを特徴としている。

(xxxi) 本発明のバイオチップキットは、(xxii)～(xxix)のいずれかのバイオチップキットにおいて、前記バイオチップのウエル側部の下端に、別途の前記容器または前記バイオチップのウエル側部の上端に設けられた凸部と嵌合する位置合わせ用の凹部、あるいは別途の前記容器または前記バイオチップのウエル側部の上端に設けられた凹部と嵌合する位置合わせ用の凸部が設けられていることを特徴としている。

(xxxii) 本発明のバイオチップの製造方法は、(i)～(xxi)のいずれかの

バイオチップを製造するに際し、組成の異なる材質で形成された少なくとも2層からなるプレートについて、片面側からパターンエッチングにより2層の境界までエッチングを行いウエル孔を形成するとともに、他面側からパターンエッチングにより2層の境界までエッチングを行いフィルター孔を形成し、これによりウエルとフィルターとが接合したバイオチップを得ることを特徴としている。

(xxxiii) 本発明のバイオチップの製造方法は、(i)～(xxi)のいずれかのバイオチップを製造するに際し、シリコンウエハーをエッチングすることによりフィルター、リブおよびウエルをそれぞれ作製し、次いで、これらを積層することを特徴としている。

(xxxiv) 本発明のバイオチップキットの操作方法は、容器がバイオチップのウエルと独立に形成されている(xxii)～(xxxi)のいずれかのバイオチップキットの当該容器に收容された溶液中でバイオチップのウエルを上下させることにより、当該容器内の溶液と、ウエル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることを特徴としている。

(xxxv) 本発明のバイオチップキットの操作方法は、(xxii)～(xxxi)のいずれかのバイオチップキットの容器に收容された溶液の界面を上下させることにより、当該容器内の溶液と、ウエル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることを特徴としている。

(xxxvi) 本発明のバイオチップキットの操作方法は、バイオチップを収納する容器を備える(xxii)～(xxxi)のいずれかのバイオチップキットの当該容器とチップとの間、あるいは当該チップにおける相互のウエル間に差圧を生じさせ、これにより、ウエル内の液体とプローブ担持粒子との接触、液体のウエル間での移動、あるいはこれらの両方を行うことを特徴として

いる。

(xxxvii) 本発明のバイオチップキットの操作方法は、バイオチップを接続する容器を備える (xxii) ~ (xxxi) のいずれかのバイオチップキットの当該容器とチップとの間、あるいは当該チップにおける相互のウエル間に差
5 圧を生じさせ、これにより、ウエル内の液体とプローブ担持粒子との接触、液体のウエル間での移動、あるいはこれらの両方を行うことを特徴としている。

(xxxviii) 本発明のバイオチップキットの操作方法は、(xxxiv) ~ (xxxvii) のいずれかの方法において、前記容器内の溶液と、ウエル内の
10 プローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることにより、バイオチップ内の内容物の混合、拡散、反応、分離または洗浄を行うことを特徴としている。

(xxxix) 本発明のバイオチップキットの操作方法は、(xxxiv) ~ (xxxviii) のいずれかの方法において、前記バイオチップの各ウエルに同一
15 の被検体を投入することを特徴としている。

(xl) 本発明のバイオチップキットの操作方法は、(xxxiv) ~ (xxxviii) のいずれかの方法において、前記バイオチップの各ウエルに異なる被検体を投入することを特徴としている。

(xli) 本発明の被検体中の標的物質とプローブとの反応方法は、(xxii) ~ (xxxi) のいずれかのキットにおけるバイオチップのウエルに、(xviii) ~ (xxi) のいずれかのチップとなるように特定の粒子をウエルに収納する
20 工程；

前記バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；およ

び

- バイオチップの容器に収容された前記溶液中でウェルを上下させるか、バイオチップの容器に収容された前記溶液の界面を上下させるか、あるいは差圧を加えることでウェル内外の溶液を循環することにより被検体中の
- 5 標的物質とプローブとの反応を行う工程を含むことを特徴としている。

(xlii)本発明の被検体中から標的物質をB/F分離する方法は、(xxii)～(xxxi)のいずれかのキットにおけるバイオチップのウェルに、(xviii)～(xxii)のいずれかのチップとなるように特定の粒子をウェルに収納する工程；

- 10 前記バイオチップのウェル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウェル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；

前記溶液の界面の高さを、ウェル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウェル内から除去する工程；および

- 15 洗浄液をバイオチップのウェルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウェルに循環させて該バイオチップのウェル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウェル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程を含むことを特徴としている。

- (xliii)本発明の被検体中の標的物質の分画分離方法は、(xxx)または
- 20 (xxxi)のキットにおけるバイオチップのウェルに、(xviii)～(xxi)のいずれかのチップとなるように特定の粒子をウェルに収納する工程；

前記バイオチップのウェル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウェル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；

前記溶液の界面の高さを、ウェル底部のフィルターの下面未満となるま

で低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウェル内から除去する工程；

- 5 洗浄液をバイオチップのウェルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウェルに循環させて該バイオチップのウェル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウェル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程；および

- 10 前記バイオチップのウェル側部の下端に設けられた凹部、凸部または平滑部と、上端にこれと対応する凸部、凹部または平滑部を有する容器を嵌合させ、次いで分離剤溶液をバイオチップのウェルに投入し、これにより前記粒子から被検体中の標的物質を分離し、前記容器のウェルに移動させる工程を含むことを特徴としている。

- (xliv) 本発明の被検体中の標的物質とプローブの相互作用の検出・同定方法は、(xxii)～(xxxi)のいずれかのキットにおけるバイオチップのウェルに、(xviii)～(xxi)のいずれかのチップとなるように特定の粒子をウェルに収納する工程；
- 15

前記バイオチップのウェル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウェル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；

- 前記溶液の界面の高さを、ウェル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウェル内から除去する工程；
- 20

洗浄液をバイオチップのウェルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウェルに循環させて該バイオチップのウェル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウェル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程；

ウェル内の粒子をフィルターの細孔に位置させる工程；および
前記粒子に担持されたプローブと被検体の標的物質との反応または相互作用を検出・同定する工程を含むことを特徴としている。

(xlv) 本発明の被検体中の標的物質とプローブの相互作用の検出・同定方法
5 法は、(xliv)の方法において、粒子ごとに、粒子のプローブ識別情報と前記粒子に担持されたプローブと被検体の標的物質との反応または相互作用の情報の双方を検出することを特徴としている。

(xlvi) 本発明の被検体中の標的物質とプローブの相互作用の検出・同定方法
10 法は、(xliv)の方法において、各ウェルごとの粒子について、前記粒子に担持されたプローブ識別情報を識別し、次いでプローブと被検体中の標的物質との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の状態情報に基づき、ウェル単位での相互作用情報を算出することを特徴としている。

本発明によれば、

- 15
- ・ 高効率に短時間で被検体中の標的物質とプローブが反応し、
 - ・ B/F 分離効率が高く、
 - ・ 高感度での定量検出が可能であるバイオチップおよびその製造方法が提供される。

また、本発明によれば、複数のウェルからなるバイオチップ同士、ある
20 いは複数のウェルからなるバイオチップと複数のウェルからなる容器との間で、直接ウェル間で液体の授受を行うことが可能であるバイオチップキットが提供される。

さらに、本発明によれば、当該バイオチップを用いた、

- ・ 一被検体から少なくとも一種類以上の標的物質の分離分画方法

- ・多数の被検体から同時並行に少なくとも一種類以上の標的物質を分離分画する方法

- ・一被検体からの少なくとも一種類以上の標的物質のアッセイ方法

- ・多数の被検体からの同時並行に行う少なくとも一種類以上の標的物質の

5 アッセイ方法が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の一実施形態によるバイオチップが備えるウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

10 図2は、フィルターの細孔の一例を模式的に示した断面図である。

図3は、補強用リブ部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

図4は、フィルター面上に補強用リブ部を設けた様子を模式的に示した上面図である。

15 図5は、フィルター面上に補強用リブ部を設けたウエル底部の電子顕微写真である。

図6は、補強用リブ部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

20 図7は、補強用リブ部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

図8は、補強用リブ部に位置合わせ用凹部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

図9は、補強用リブ部に位置合わせ用凹部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

図 10 は、ウエルの底部上面に、その周縁から所定の幅で無孔部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

図 11 は、リブあるいはウエルを光造型で作製する方法を説明する図である。

5 図 12 は、本発明の一実施形態によるバイオチップの上面図および A-A' 断面図である。

図 13 は、本発明の一実施形態によるバイオチップの上面図および A-A' 断面図である。

10 図 14 は、第一のフィルターとともに第二のフィルターを備えるバイオチップの断面図である。

図 15 は、バイオチップと容器を接続したバイオチップキットの作製方法を説明する断面図である。

15 図 16 は、バイオチップキットの容器の底部あるいは蓋部となるプレートに、光学検出用として平滑で透明なプレートを用いた例を示した断面図である。

図 17 は、プレートを用いて容器を形成したバイオチップキットの例を示した断面図である。

図 18 は、チップを多段に設けたバイオチップキットの例を示した断面図である。

20 図 19 は、複数のウエルからなるチップを作製する方法を説明する図である。

図 20 は、本発明に係るバイオチップの操作方法を説明する図である。

図 21 は、本発明に係る被検体中の標的物質の分離分画方法および検出方法の一工程を説明するチップ断面図である。

図 2 2 は、本発明に係る被検体中の標的物質の分離分画方法および検出方法の一工程を説明するチップ断面図である。

図 2 3 は、本発明に係る被検体中の標的物質の分離分画方法の一工程を説明するチップ断面図である。

5 図 2 4 は、容器のウェル底面に微細な貫通孔を設けたバイオチップキットの断面図である。

図 2 5 は、本発明に係る被検体中の標的物質の検出方法の一工程を説明するチップ断面図である。

図 2 6 は、ウェルにプローブ担持粒子を収納した本発明のバイオチップ
10 の一例を説明する図である。

図 2 7 は、本発明のバイオチップのウェルに被検体を投入する方法を説明する図である。

図 2 8 は、プローブ担持粒子をフィルター孔上に位置させた電子顕微写真である。

15 図 2 9 は、チップの各ウェルの底部を撮像した電子顕微鏡写真である。

図 3 0 は、牛血清希釈液を実施例 3 のチップのフィルターに流し、下容器の下蓋から牛血清希釈液を排出した際における、合計の吐出量と吐出時間との関係を示したグラフである。

図 3 1 は、チップの孔径と孔間隔が異なる 8 種類の組み合わせについて、
20 差圧 18 g f / c m^2 で実施例 3 と同様の試験を行った試験結果を示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、図面を参照しながら本発明を具体的に説明する。図 1 は、本発明

の一実施形態によるバイオチップが備えるウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

同図に示したように、このウエル 16 は、細孔 19 が形成されたフィルター 18 が底部に設けられている。このフィルター 18 は、被検体あるいは被検体を溶解もしくは分散した媒体などの液体を通過させるとともに、
5 ウエル 16 内に収納された、被検体と相互作用するプローブ担持粒子が外側へ排出しないように構成されている。

本発明では、フィルター 18 に、均一な孔径を有するストレートな細孔が、均一な孔間隔で形成されている。なお、本明細書において「均一な孔径」とは、孔径の誤差が C V (Coefficient of Variation) 値で 20 % 以下、
10 好ましくは 10 % 以下であることを意味する。孔径誤差が C V 値で 20 % 以下であるような細孔は、後述する方法によって作製可能であり、ウエル 16 内に収納されるプローブ担持粒子と孔径との寸法差を僅少とすることができる。

15 従来から使用されているメンブレンフィルター等の孔径には 10 倍程度のばらつきがあり、例えば 0.2 μm 孔径のフィルターを使用する場合には、確実に濾過できる粒子径は 5 μm 程度となる。これと比較して、上記のように均一な孔径を有するフィルターを使用した場合には、フィルターの細孔の孔径は非常に均一であるため、粒子径と孔との差を小さくすることができ、そのために孔径をより大きくすることができ、フィルターの濾過性を向上するとともに、濾過圧力が低減される。

このように均一な孔径を有するフィルターにおいて、その細孔の孔径は、特に限定されないが、通常 0.01 μm ~ 100 μm 、好ましくは 0.1 μm ~ 50 μm 、より好ましくは 0.5 μm ~ 15 μm である。

また「均一な孔間隔」とは、孔間隔の誤差が C V (Coefficient of Variation) 値で 15 % 以下であることを意味する。孔間隔には特に限定はないが、孔間隔があまりに狭いとフィルターの強度が弱くなり、また孔間隔があまりに広いと開口率が下がることから、通常は孔径の 2 倍以下であり、且つ 0.5 μm ~ 10 μm であることが好ましい。なお、「孔間隔」とは隣接する各孔の間における孔が空いていない部分の最短距離のことである。

また、本明細書において、「ストレート」な細孔とは、細孔が途中で分岐することなく形成されていることを意味する。例えば、一方のフィルター表面に形成された開口の中心から他方のフィルター表面への垂線と、この他方のフィルター表面に形成された開口の中心から前記一方のフィルター表面への垂線とがずれていても、圧力損失という点ではそれほど遜色がないため、このような細孔であってもよい。また、当該垂線が実質的にずれていない細孔であり且つフィルターの一次側（上面側）の孔径が二次側（下面側）の孔径と異なっているものであってもよい。このような細孔形状としては、例えば図 2 (a) ~ (d) に示したような形状が挙げられる。貫通方向と垂直な細孔断面の形状は特に限定されず、円柱、四角錐、多角錐などいずれであってもよいが、メニスカスを最小限にする点から鈍角形状あるいは円形であることが望ましい。但し、ウエルの容積が所定量以上、例えば 0.1 マイクロリッター以上の場合には、メニスカスはそれほど問題とならず、四角柱や四角錐などであっても問題ない。

このようにストレートな細孔とすることにより、フィルターを形成する細孔長さが最小となるため、細孔壁との接触面積が減少し、濾過に伴う圧送抵抗を最小限とすることができる。

また、プローブ担持粒子がフィルターの一次側に堆積して目詰まりを起こした場合であっても粒子がフィルターの内部に入り込まずにフィルター表面に留まり（いわゆる完全閉塞モデルとなる）、フィルター二次側からのフラッシングによって粒子をフィルター表面から一次側へ容易に分散させることができる。このため、フィルターの目詰まりを再度解消して再生させることができ、フィルターの寿命を延ばすことができる。

以上のように、フィルターに均一な孔径を有するストレートな細孔を、均一な孔間隔で形成することによって、プローブ担持粒子は一次側の開口上に配列され、必要に応じて被検体などの液体を二次側からフラッシングして粒子を一次側へ分散させることも可能であり、被検体とプローブ担持粒子との反応や検出を容易に行うことができる。

さらに、プローブ担持粒子がフィルターの二次側に排出されることが許されず、粒子を100%捕捉する必要がある場合には、フィルターの孔径を粒子の最小径よりも大きくするように粒子サイズなどを考慮することで、透過係数と濾過効率を低下させることなく100%の粒子捕捉が可能である。

一般的な濾紙やメンブレンフィルターは孔径、孔間隔が均一ではなく、また、孔自体が三次元的に入り組んだ構造をしており、フィルター内部にフィルター表面よりもさらに細かい孔が存在する。このため、濾液中に含まれる粒子の一部はフィルター内部の孔に捕捉され、中間閉塞モデルと称される目詰まりを生じ、この目詰まりを解消するために二次側から液体を送り込みフィルターに存在する粒子をフィルター内から一次側に取り出す際に、フラッシングによる効果が充分ではなく全ての粒子はフィルターから一次側に取り出せず、フィルター内に閉じ込められて検出用に使用される

粒子が減少する。さらに、フィルターの粒子捕捉効率は確率的であり、100%の捕捉効率とするためには「ふるい対象となる粒子径分布の最小粒子径>フィルター径分布の最大径」となるフィルターを選択する必要があるが、これによって透過係数と濾過効率が低下する。

- 5 本発明では、フィルターの厚さは好ましくは1~10 μ m、より好ましくは2~7 μ mである。フィルターの厚さが10 μ mよりも大きい場合、液体の濾過時に濾過抵抗が大きくなり、フィルターの厚さが1 μ m未満である場合、フィルターの機械的な強度が不足する。

- 10 本発明では、フィルターの開口率は好ましくは15~60%、より好ましくは20~50%である。開口率が15%未満である場合、濾過効率が低下し、開口率が60%よりも大きい場合、フィルターの機械的な強度が不足する。

- 15 フィルターは、細孔を有する各種の形態のもので形成することができる。具体的には、金型によるプレス、織布、フィルムにレーザーもしくは中性子線で穿孔して形成したフィルター、樹脂もしくは金属薄膜に傷をつけて張力により孔を拡大したもの、基材をフォトエッチングにより穿孔したものの、樹脂成型によるものなどが挙げられる。

- 20 前述したような、均一な孔径を有し、均一な孔間隔で形成された細孔を有するフィルターは、例えばフォトリソグラフィによる方法で作製することができ、所定の有機あるいは無機のフィルムにレジストを塗布し、パターンエッチングすることにより所定の孔を空けてフィルターを形成する。所定の機械的強度を有する膜厚と所定の孔径を確保するためには、高アスペクトのエッチングが必要であるが、異方性エッチングによりこれを行うことができる。

また、エキスパンドメタルによる方法で作製することも可能である。例えば、厚さ $30\ \mu\text{m}$ のステンレス箔に、金型にて千鳥状に切れ目を入れ、これを押し広げてひし形状の貫通孔を形成する。この方法によれば、ひし形孔の最大距離が $30\ \mu\text{m}$ であり、開口率が 60% 程度のフィルターが得られる。次いで、得られたエキスパンドメタルフィルターを、さらに凸金型でプレス処理して所定の凹面を形成することによって、一体に形成された複数のウエルを得る。あるいは、別途に樹脂もしくは金属にて、ハニカムあるいは丸型などの上下が貫通したウエル群を作製し、ウエル群の底面に熱可塑性樹脂溶液を塗布乾燥して、加熱したフィルターとウエルとを熱

5 接着することによって上記のエキスパンドメタルフィルターとウエル群とを接着してウエルを形成する。

また、後述するように、ウエル側部とフィルターとを樹脂にて一体成型する方法で作製することも可能である。

バイオチップの特に好ましい製造方法として、組成の異なる複数の材質からなるプレート、例えばアルミ／アルミナ、金属シリコン／シリカ、あるいは金属チタン／チタニアなどについて、それぞれ両側からパターンエッチングを行うことにより、フィルターとウエルを形成する方法が挙げられる。具体的には、例えばアルミナ、シリカ、チタニアなどの金属酸化物層について、この金属酸化物層と金属層との境界までをフォトリソグラフィによってフィルターを形成し、次いで、アルミ、金属シリコン、金属チタンなどの金属層について、この金属層と金属酸化物層との境界までフォトリソグラフィすることにより、ウエルとフィルターとが接合したバイオチップを作製できる。

15 20

この方法によれば、予め金属と金属酸化物などが一体となった複層材料

を使用することにより、フィルターとウエルが一体接合したものを作製することができ、フィルターとウエル間の界面からの液漏れなどの懸念がなくなる。

- 5 また、フィルター層としてアルミナ、シリカ、チタニアなどの透明材料を使用することができるため、光検出により検出を行う場合、フィルター層を介して直接粒子の挙動を見ることができる。

- 10 フィルターを形成する材料としては、濾過抵抗を減少する等の点から、ウエルに収容される溶液と親和性の高い材料、具体的には、溶液が水系の場合は親水性の材料、溶液が油性の場合は親油性の材料を選択することが望ましい。

- 15 親水性の有機材料としては、例えばポリエチレンビニル樹脂、架橋ポリビニルアルコール樹脂、ポリグリコール酸樹脂、ポリアミド樹脂、ポリイミド、セルロースアセテート樹脂、トリアセチルセルロース、硝酸セルロース樹脂、エポキシ樹脂、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとメタクリレートとの共重合体などの各種アクリレートの共重合体などが挙げられる。

- 20 親油性の有機材料としては、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメチルメタアクリレート樹脂、液晶ポリマー、ポリカーボネート、ポリアミド樹脂、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、シクロオレフィン、ポリメチルペンテン、ポリアリレート、ポリサルホン、ポリエーテルサルホンなどが挙げられる。

また、無機材料としては、例えば鉄、ニッケル、銅、亜鉛、アルミニウム、シリコン、チタン、タンタル、マグネシウム、モリブデン、タングステン、ロジウム、パラジウム、銀、金、白金、ステンレス、真鍮、黄銅、

青銅、燐青銅、アルミ銅合金、アルミマグネシウム合金、アルミマグネシウムシリコン合金、アルミ亜鉛マグネシウム銅合金、鉄ニッケル合金等の金属；シリカ、アルミナ、チタニア、ジルコニア、酸化タンタル等の金属酸化物；SiN、TiN、Ta₂N等の金属窒化物；SiC、WC等の金属炭化物；ダイヤモンド、グラファイト、Diamond Like Carbon(DLC)等の炭素材料；ソーダガラス、ホウ珪酸ガラス、パイレックス(R)、石英ガラス等のガラスなどが挙げられる。

また、親油性材料の表面に、プラズマ処理、コロナ処理あるいはイオン処理などを施して、ヒドロキシル基やカルボキシル基などを形成してもよい。また、メッキなどにより表面に親水性の金属あるいは金属酸化物を形成してもよく、あるいは、例えば2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとメタクリレートとの共重合体、ポリエチレングリコール誘導体などの親水性材料をコーティングしてもよく、あるいはグリシジルメタクリレートを塗布した後にエポキシ基を開環してもよい。

これらの中でも特に、表面材質がアルミナ、シリカ、チタニアであるものがフィルターの材料として好ましい。これらは親水性であるため、バイオ検体の非特異的な吸着が低く、またフィルター内に水系の検体や洗浄液が容易に浸入する。さらに、表面だけではなく内部までこれらと同一材質とすることにより、フィルターが透明になるので、検出方法として光学的な検出方法を使用する場合、粒子プローブと検体マーカとの反応、相互作用を透明なフィルターを通して容易に検出・同定することができる。

表面材質がアルミナ、シリカ、チタニアである材料でフィルターを形成する場合、アルミ、金属シリコン、あるいは金属チタンを用いてフィルターとウェルからなるチップを形成し、その後に酸化してアルミナ、シリカ、

チタニアにしてもよく、あるいは、アルミ／アルミナ、金属シリコン／シリカ、金属チタン／チタニアからなるプレートを用意して、このプレートを用いてウエルとフィルターとを形成してもよい。

<ウエル部>

- 5 一つのバイオチップが有するウエルの数には特に限定は無く、収納するプローブ付き粒子の種類あるいは粒子の個数により任意に設定可能であり、単一ウエルからなるチップ、あるいは一体に形成された複数のウエルからなるチップのいずれであってもよい。また、プローブ付き粒子の種類が一種類でも分離精製用など多数の粒子を収納する場合には、複数のウエルを
- 10 設けて各ウエルに同一のプローブ粒子を分散収納することも可能である。

- ウエルは図1 (a)、(b) に示したように、フィルターと異なる材料により形成することができ、また図1 (c) に示したように、フィルターと実質的に同一の材料で一体に形成することができる。また、図1 (a)、(b) ではフィルター材料とウエル材料がこれらが異なる材料で形成されている
- 15 が、同一材料でフィルターとウエルとを別途に形成した後、これらを接合することも可能である。

ウエルは、図1 (b)、(c) のように、フィルター層におけるフィルターが形成されていない部分でフィルターと連結されることが、機械的な強度の面では好ましい。

- 20 ウエル部の径と高さには特に限定はなく、必要な粒子の個数と反応容積にしたがって任意に設定可能である。ウエルの径が大きくなる場合、フィルター面の面積も大きくなり、フィルターに掛かる総圧力によりフィルターが撓むか、あるいは破壊される可能性があるが、後述のリブを設けることにより、このような撓みあるいは破壊を防止することが可能である。

また、複数のウエルを持つチップでは、これらのウエルの径は必ずしも同一である必要はなく、収納する粒子の数や反応容積を勘案して異なる径のウエルを設けることも可能である。

- 5 ウエル側部からなるウエル孔の形状は、特に限定されないが、メニスカスを最小限にするために鈍角あるいは円型が望ましい。

<補強用リブ部>

- 上述したような底部にフィルターを設けたウエルでは、フィルターの厚さが薄いために、ウエルの孔径が大きい場合や、あるいはフィルターの開口率が大きい場合にはウエル底部の強度が充分ではなく、使用時などにフ
10 イルターが破損もしくは損傷し易くなる。そこで、このような場合には、フィルターの上面側または下面側に、リブ状の補強手段を設けてウエル底部を補強することが望ましい。

- 図3は、このような補強用リブ部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。図3(a)では、フィルター18の下面側に突条部位
15 を有するリブ部23が設けられている。図3(b)では、フィルター18の上面側にリブ部23が設けられている。

- 図4は、補強用リブ部23をフィルター18の面上に設けた様子を模式的に示した上面図である。同図に示したように、その形状は複数の貫通孔29が形成された一体形状として、貫通孔29の間を連続したリブとすることが好ましい。貫通孔29の貫通方向とほぼ垂直な断面は、円形、矩形、六角形のような多角形など特に限定されないが、メニスカス現象を低減するために円形かあるいは六角形などの鈍角多角形が好ましい。図5に、実際にフィルター上に補強用リブ部を設けたウエル底部の電子顕微写真を示す。

補強用リブ部のリブ高さは、ウエルの底面積やリブの材質にもよるが、好ましくは $10\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ 、より好ましくは $100\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ である。

5 このように補強用リブ部を設けることによりフィルターの機械的強度が向上し、チップ面積が大きいものを使用することができる。また、フィルターが薄くても機械的圧力に対する耐性が得られるとともに、フィルターの孔の深さが浅いものを使用することができるため、濾過圧力をより低減することができる。

補強用リブ部は、図6 (a) のようにフィルターと別途に形成して接合
10 するか、あるいは図6 (b)、(c) に示したように、フィルター18の細孔をリブあるいはウエル材料をアディティブ法等で潰して埋めることにより接合するようにしてもよい。ウエルの側壁20は、フィルター18を貫通させてその貫通した下端部を補強用リブ23の一部とすることができる。

別途に形成された補強用リブ部もしくはウエル側壁をフィルターと接合
15 する場合、接着剤を使用せずに直接接合することが好ましい。直接接合は、フィルターと補強用リブ部もしくはウエル側壁を積層法により積み上げて形成する方法など、後述する方法で行うことができる。

この方法では接着剤等を介さずに直接接合されているため、濾過に際して補強用リブ部もしくはウエル側壁とフィルターとの界面が剥離したり、
20 あるいは界面に濾過対象液が入り込むなどの問題点が解消される。特にウエルの開口径が小さく、ウエル数が多いチップの場合には、ウエル側壁とフィルターとの接合は幾何級数的に困難となり界面で液漏れし易くなるが、接着剤を介することなくウエルとフィルターとを直接接合することにより液漏れの懸念が解消される。また、補強用リブ部はフィルターの機械的な

補強材として設置されており、フィルターとの接着が不十分の場合には機械的強度の向上が期待できない。

しかし、このように接着剤を介さずに直接接合することでフィルターとリブとが十分な強度で一体化し、機械的強度が向上する。

- 5 また、図 7 (a)、(b) に示したように、補強用リブ部をフィルターと同一材料で連続形成することも可能であり、一体形成されているため強度的に望ましい態様である。ここで同一材料とは元の素材が同一であればよく、例えば金属シリコンの一部を酸化して酸化シリコンとしたシリコンシリカ材料、金属シリコンの一部を炭化あるいは窒化して SiC や SiN と
- 10 したシリコン/SiC、シリコン/SiN 材料等も、同一材料とみなされる。ウエルの側壁も同様にしてフィルターと連続形成することができる。その製造方法としては、あらかじめフィルターを作製するに際してウエルやリブ部については穿孔せずに、次いでウエルやリブを形成する際にその部分に位置合わせしてウエルやリブを形成するなどして、フィルターと補
- 15 強用リブ部もしくはウエル側壁を同一素材から切削あるいはエッチングにて作製する方法など、後述する方法で行うことができる。

- また、リブ 23 あるいはウエル側壁 20 の部分におけるフィルター 18 の細孔は必要に応じて無くすることもできる。具体的には、図 1 (b)、(c) のようにフィルター 18 の作製時に予め細孔の無い部分を形成しておき、
- 20 リブ 23 あるいはウエル側壁 20 をこの細孔が無い部分の上に位置合わせして作製するか、あるいはリブ 23 とフィルター 18 をアディティブ法により作製する場合には、同時に穴埋めする方法で行うことができる。

図 8 (a)、(b) および図 9 (a)、(b) に示したウエルでは、フィルターの下面あるいは上面に前記補強用リブ部 23 を設けるとともに、この

補強用リブ部 23 におけるウエル側部 20 の下端側の位置に、別途の容器に設けられた凸部と嵌合する位置合わせ用の凹部 27 が形成されている。凹部 27 の具体的な形状は別途の容器に設けられた凸部に応じて適宜の形状とすることができる。すなわち、ウエルに形成された凹部 27 は所定ウエル内の溶液を別の容器の所定ウエルに移し替える際に、容器のコネクタ
5 ーとなるメス型部分の溝であり、容器のオス型部分と嵌合させることで、ウエル内の溶液を容器の所定部分以外に漏らすことなく移動させることが可能となる。位置合わせ用の凹部の溝形状は、メス型として容器に設けられたオス型の凸部に嵌合できるものであれば特に限定されない。

- 10 また、ウエルの位置合わせ用の凹あるいは凸部を設けることなく、図 8 (c)、図 9 (c) に示したように凹部 27 を形成せずに底面を平滑とすることによっても接合を行うことができる。この平滑面は、平滑であるほど面同士の接合がより強固となる。例えば市販の半導体用のシリコンウエハー、特に超平滑シリコンウエハーを用いることで、きわめて強固な平滑接
15 合面を得ることができる。

上記のような位置合わせ用の凹部を設けたウエルによる液体移動は、移動溶液を収容したウエルと、対応する複数のウエルを持つ容器がそれぞれ多数存在する場合に、全ての対応ウエルの溶液を同時並行で対応するウエル間で移し変える際に有効である。また、複数のウエルを持つ容器から対
20 応するウエルを持つチップへの液体移動、あるいは複数のチップ間での液体移動にも適用可能である。

これらの溝を有するリブは後述する各種の製造方法により一般のリブと同様に作製することができる。ウエル側部の幅や形状は、特に限定されないが、ウエル側部の幅は好ましくは 100 μm 以上、より好ましくは 20

0 μm 以上10mm以下、さらに好ましくは300 μm 以上5mm以下である。ウエル側部の幅が100 μm 未満の場合には、位置合わせ用の凹部を容器の凸部と嵌合させる事が困難となり、あるいは平滑面同士を接合した場合に、接合面積が位置合わせのずれによって少なくなる。ウエル側部
5 の幅が10mmを超える場合には、所定面積中におけるウエル部分の占める部分が過度に小さくなり、チップの作成効率が低下する。

上述した位置合わせ用の凹部は、補強用リブ23の一部であるかどうかに関わらず、ウエルの側部20の下端に形成される。このウエルの下端に形成される凹部は、逆に凸部であってもあるいは平滑であってもよく、そ
10 の場合は対応する容器あるいはチップに嵌合用の凹部あるいは平滑部を形成する必要がある。

図10に示したウエルでは、ウエルの底部上面に、その周縁から所定の幅で、フィルター18の細孔19が形成されていない無孔部28が設けられている。

15 この無孔部28の所定の幅としては、ウエル底部の周縁から好ましくは5 μm ～50 μm 、より好ましくは10 μm ～30 μm である。特に、図10(b)に示したように、無孔部28の面が傾斜していることが好ましい。この無孔部が無く、リブやウエルの壁際まで細孔が設けられた場合には、粒子が壁際に滞留したり、あるいはさらに堆積するなどの現象を起こ
20 す場合がある。無孔部を設けることで、ウエルとフィルターとの接続部における機械的な強度が増し、剥離の可能性が低減する。また、溶液はウエルやリブの壁際から中心部に移動する層流を起こし、粒子がウエルやリブの壁際に滞留あるいは積層することが防止される。さらに、後述する光学的検出に際して、壁際に粒子が無いために、ウエル壁からの光反射により

壁際の粒子の検出が阻害されることを防止することができる。

- この無孔部を有するウエルは、あらかじめ特定領域に無孔帯を設けたフィルターを作製し、ウエルあるいは補強用リブを無孔帯の部分に位置合わせして接合する方法、あるいは無孔帯にウエルあるいは補強用リブをアディティブ法等で積み上げる方法などによる方法で作製することができる。
- 5 また図10(b)のような、無孔部28の面が傾斜している構造は、あらかじめフィルター部を形成した後に、ウエルの高さ方向にウエットエッチングして、エッチング残りを残すことにより形成することができる。

以下に、上述してきたウエルの各種製法について説明する。

- 10 第一の方法は、フィルターなどを電気メッキにより積み上げる方法である。本方法では、あらかじめ導電性処理が為された基板を用意し、その上にレジスト等でパターニングを行い、電気メッキしない部分をレジストで保護して、基板とメッキ溶液との間に電流を流すことにより基板の所定部分にのみ金属あるいはイオン性のポリマー材料を形成する。
- 15 先ず、導電性処理が為された基板を用意し、その上にレジストを塗布する。これらのレジストを導電性基板の上に膜形成した後、フォトマスクを用意してUV光にて露光現像し、導電性シートの上にフィルターの反転パターンであるレジストのポストを形成する。これらの方法によるパターン限界はレジストの解像度に依存するが、例えばTHB-110N(商品名:
- 20 JSR株式会社製)を使用することで、パターンピッチで5 μ m、アスペクト比で2のレジストポストを作製することができる。

次いで、これらのポストの間に、電気メッキ法によって金属あるいはイオン性の樹脂を交流あるいは直流の電流を流して電氣的に充填する。電気メッキ法により充填される金属材料としては、金、ニッケル、銅、鉄、鉄

ニッケル合金等が挙げられる。ニッケル電鍍のためのメッキ液としては、スルファミン酸ニッケル浴(スルファミン酸 60%液 700g/l、臭化ニッケル 5g/l、硼酸 35g/l の混合液、浴温 50℃)などが用いられ、銅電気メッキ液としては、硫酸銅浴(硫酸銅 200g/l、硫酸 60g/l、塩素イオン 30mg/l の混合液、浴温 30℃)などが用いられ、鉄電気メッキ液としては、スルファミン酸鉄浴(スルファミン酸鉄 400g/l、スルファミン酸アンモニウム 30g/l、ホルマリン 100mg/l の混合液、浴温 46℃)などが用いられる。例えば、スルファミン酸ニッケル浴の場合、電圧 6 V、電流密度 3 A/dm^2 で 10 から 20 分程度直流を流すことによって厚さ $5 \mu\text{m}$ の電気メッキ物を得ることができる。

また、電気メッキ法により充填される樹脂材料としては、エポキシ樹脂、アクリル樹脂、ポリイミド樹脂等が挙げられる。これらの樹脂としては、例えば株式会社 シミズ エコート社のもの、日本ペイント株式会社のパワー トップ U などのアクリル樹脂などが使用可能である。

また金属、樹脂何れの場合も各種の添加剤を添加することができ、例えばシリカ、チタニア、アルミナ等の金属酸化物微粒子、フッ素樹脂微粒子などを添加することで、形成された膜の化学的な性質を変化させることができる。

次いで、樹脂電鍍の場合には、最後に約 200℃ の加熱により樹脂をキュアすると同時にレジストを焼成除去する。電気メッキ法の場合には、例えばレジストストリッパー THB-S1 (商品名: J S R 株式会社製) によりレジストを除去する。

このようにしてフィルターを作製した後、ウェルあるいは補強用リブ部を、フィルターの形成方法と同様に、さらに電気メッキ法により形成する

ことができる。すなわち、上記と同様にフィルターの上にレジスト膜を形成し、フォトエッチング、電気メッキ法材料の充填を行う。この場合、一般にウエルの高さはフィルターの厚さ以上であるためにレジスト膜も厚くなり、このためレジストはドライフィルムレジストを積層して使用することが好ましい。一般に、線幅と厚さのアスペクトが2を超えるメッキ物の形成は1回では困難であり、このような場合にはフォトエッチングと電気メッキ法によるメッキ物の形成を数回繰り返すことで所定の高さのウェルとする。

第二の方法では、フィルター、ウェル、補強用リブ部の少なくともいずれれかをエッチング方法により作製する。エッチングの対象物は、フィルターを形成できるものであれば、金属、金属酸化物、有機物など特に限定されないが、特に好ましいのは、機械的強度が高い材料であり、具体的には、例えば液晶ポリマー、ポリカーボネート、ポリアミド樹脂、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、ポリアリレート、ポリサルホン、ポリエーテルサルホンなどのエンジニアリングプラスチック；鉄、ニッケル、銅、亜鉛、アルミニウム、シリコン、チタン、タンタル、マグネシウム、モリブデン、タングステン、ロジウム、パラジウム、銀、金、白金、ステンレス、真鍮、黄銅、青銅、燐青銅、アルミ銅合金、アルミマグネシウム合金、アルミマグネシウムシリコン合金、アルミ亜鉛マグネシウム銅合金、鉄ニッケル合金などの金属；シリカ、アルミナ、チタニア、ジルコニア、酸化タンタルなどの金属酸化物；SiN、TiN、Ta₂Nなどの金属窒化物；SiC、WCなどの金属炭化物；ダイヤモンド、グラファイト、Diamond Like Carbon(DLC)などの炭素材料；ソーダーガラス、ホウ珪酸ガラス、パイレックス（商標）、石英ガラスなどのガラスが

挙げられる。

エッチングは通常の方法によって行うことができる。但し、アスペクト比が余りに大きいエッチングはその孔径や形状が不均一になる可能性があり、実質的には、通常の化学エッチングで得られるアスペクト比としては
5 5以下、好ましくは3以下である。但し、このアスペクトの範囲で積極的に逆テーパ形状が形成されたフィルターを使用することで濾過性の良好なフィルターを得ることもできる。

また、ウェルやリブ形状をエッチングで作製する場合には、アスペクト比が5以上となることが望ましく、材料の異方性エッチングによりアスペクト5以上のエッチングを行うことができる。例えば、シリコンなどの単結晶材料でKOH水溶液やエチレンジアミン・ピロカテコール(EDP)、4メチル水酸化アンモニウム(TMAH)などのエッチング液に対して大きな結晶依存性を示すことを利用する。シリコンの場合は(111)面のエッチング速度が他の結晶面に対して極端に遅く、(110)面を表面としたシリコン
10 ウエハを用いてマスク材の開口のある辺を(111)面方向と揃えて化学的エッチングを行うことでアスペクト100程度のエッチングを行うことが可能である。これらの方法は、精密工学会、編著：「ナノスケール加工技術」、日刊工業新聞社(1993)に記載されている。
15

また、必要に応じて、プラズマを用いた反応性イオンエッチング(RIE)を行うことができる。例えば、SF₆にフロン系の塩素ガスを含むガスによって基板に垂直な異方性エッチングを行うことができる。これらの方法は、「『02最新半導体プロセス技術』、プレスジャーナル社(2001)に記載されている。
20

特に、組成の異なる複数の材質からなるプレート、例えばアルミ／アル

ミナ、金属シリコン／シリカ、あるいは金属チタン／チタニアなどについて、それぞれ両側からパターンエッチングを行うことによりフィルターとウェルを形成する方法が好ましい。具体的には、例えばアルミナ、シリカ、チタニアなどの金属酸化物層について、この金属酸化物層と金属層との境界までをフォトエッチングしてフィルターを形成し、次いで、アルミ、金属シリコン、金属チタンなどの金属層について、この金属層と金属酸化物層との境界までフォトエッチングすることにより、ウェルとフィルターとが接合したバイオチップを作製できる。

この方法によれば、予め金属と金属酸化物などが一体となった複層材料を使用することにより、フィルターとウェルが一体接合したものを作製することができ、フィルターとウェル間の界面からの液漏れなどの懸念がなくなる。

また、フィルター層としてアルミナ、シリカ、チタニアなどの透明材料を使用することができるため、光検出により検出を行う場合、フィルター層を介して直接粒子の挙動を見ることができる。

このような複層材料としては、例えばアルミ板の表面を所定の厚さまで酸化してアルミナとしたアルミ／アルミナ板、金属チタンを同様に酸化した金属チタン／チタニア、酸化膜付きシリコンウエハー、あるいはSOI (Silicone On Insulator) ウエハーなどが挙げられる。

また、エッチング法によりシリコンウエハーをエッチングしてフィルター、リブおよびウェルを個別に形成し、シリコンウエハーの平滑性を利用してこれらを積層してチップとすることも可能である。この場合、フィルター、リブおよびウェル用のシリコンウエハーの厚さはそれぞれに適宜設定され、エッチング方法もドライエッチングとウェットエッチングをそれ

ぞれフィルター、リブおよびウエル毎に使い分けることも可能である。

この方法では、フィルターとリブもしくはウエルとを同一材料でエッチングする方法に比べて、段差のある穴を開ける必要が無く、フィルター、リブおよびウエル毎に設定された径の貫通穴を開けた後、これらを積層して組み立てるだけであるため作製が簡便である。また、シリコンの平滑性により接合を行う、接着剤を使用しない界面接合により接合しているので、界面からの液漏れが無く、且つ剥離強度の高いチップを作製することが可能である。

10 フィルター、リブおよびウエルを所定の位置間隔で積層するためには、あらかじめこれらに位置合わせマークを設けてこのマークにより位置合わせすることが好ましい。また、液中で積層する場合、積層プレートの横ずれによる積層面の剥離を防止するために、積層面をクランプすることが望ましい。

第三の方法では、フィルターを金属の陽極酸化により作製する。対象金属としては、アルミニウム、シリコンなどが挙げられる。以下、アルミニウムを例として具体例を示す。先ず、アルミニウムの板を用意する。アルミニウム板は場合により片側にウエルの深さよりも約 $100\ \mu\text{m}$ 程度の浅い凹面をあらかじめ形成しておくが好ましい。例えばウエルの深さを $5\ \text{mm}$ 、フィルターの厚さを $20\ \mu\text{m}$ とする場合は、アルミ板の厚さが $5.0\ \text{mm}$ であり $4.9\ \text{mm}$ の凹面を持つアルミ板を用意する。凹面内部に、陽極酸化工程中の機械的な強度維持を目的として、モンタン酸ワックス、ポリエチレンワックス（クラリエント株式会社製）などのワックスなどの充填物を充填しておき、フィルター形成の後に熱溶融除去することも可能である。

次いで、これらの凹面とは反対側に、フィルターの孔を空けるための先導孔を形成する。この先導孔はピッチが $1\text{ }\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 以下であり、深さが $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 以上であることが好ましい。これらの先導孔は、金型を用いたスタンピングによる方法の他に、レジストによるフ
5 オトエッチングでも得ることができる。

次いで、これらのアルミをシュウ酸あるいは硫酸溶液中で電圧を掛けながら陽極酸化する。その具体的な方法は、特開2003-11099号公報に記載されている。陽極酸化によりフィルターを作製した後、アルミに形成された凹面の底面と、フィルター孔とを貫通させるために、アルミウ
10 エルの凹面にリン酸、フッ酸、硝酸などの強酸あるいはこれらの混酸あるいは塩化第二鉄を滴下する。例えば塩化第二鉄の場合は 50°C 、20時間エッチングすることによりウエル底面をフィルター孔面まで貫通させることが可能である。これらの方法は応用物理 第69巻 第5号(2000)、特開2000-258650号公報などに記載されている。この陽極酸化
15 による方法によれば、孔径が $5\sim450\text{ nm}$ 、アスペクト比約100、大きさが $5\sim10\text{ mm}$ 程度のフィルターを作製することが可能である。

第四の方法では、フィルターを樹脂のナノプリントで作製する。まず、ナノプリントによるフィルターを形成するためのベース板を用意する。ベース板は平滑な板か、あるいはウエル孔とするためにあらかじめ約 100
20 μm 程度の底部厚さを残した凹面を有する板でもよい。この凹面も上記と同様にワックスなどを充填してもよい。

あらかじめナノプリント用の型を用意しておく。型の製造方法は特に限定はないが、孔径が数十 μm 以下である孔を設けた型は製造方法が限定され、一般にはシリコンの結晶異方性を利用した異方性エッチングやX線リ

ソグラフィーによる方法によるいわゆるMEMS (Micro Electro Mechanical System) 技術により得られる。あるいはMEMS技術により作成された型を元に金属メッキをした反転型を使用することも可能である。この様にして用意された型は、プレス装置に装着される。このナノプリント装置としては、株式会社テクトリアのNPHT-1、株式会社日立製作所のナノプリント装置、明昌機工株式会社のナノプリント装置などを使用できる。

ナノプリントによって成型する樹脂としては、流動性の良好な樹脂が好ましく、液晶ポリマーや結晶性のナイロン樹脂などが好適である。あるいはエポキシ樹脂やウレタンアクリレートなどのオリゴマーをプレスと同時に光硬化あるいは熱硬化させてもよい。エポキシ樹脂やウレタンアクリレートは液状の樹脂の他にプリプレグフィルム状のものも使用可能である。

これらのナノプリントによりプレス成型されたフィルターは型抜きせずに底面に皮状の樹脂を残す方が成型の失敗が少なく、型が抜きやすい。また型抜きの容易性や型の損傷を考慮すると形成する孔はアスペクト比で10以下が好ましく、より好ましくは5以下である。

また、成型時に積極的に皮部分をウェル部分として残し、別途にこの皮部分を掘削あるいはエッチングにてウェル形成することが可能である。フィルム残渣をウェルとして利用する場合は、具体的にはベース板より樹脂残渣シートを剥離した後、剥離部分をドリル穿孔するか、あるいはフォトエッチングを行うことによりフィルター部分まで貫通孔を空けることが可能である。あるいは途中までを機械的に穿孔した後、最後の数十～数百 μ mを酸やアルカリなどによりエッチング除去することも可能である。

第五の方法では、リブあるいはウェルを光造型で作製する。まず、上述

した電鍍、エッチング、金属の陽極酸化、樹脂のナノプリントのいずれかの方法によりフィルターを作成する。あるいはプレス加工、エキスパンドメタル法により作製されたフィルターなどを使用することも可能である。これらのフィルターをベース板として、あるいはフィルターを別のベース

5 板の上に固定してその上にウエルあるいはリブを形成する。

具体的には、図 1 1 (a) に示したようにベース板 7 1 にフィルター 1 8 を固定して、光造形機バス 7 2 へ設置し、ベース板 7 1 を支持するエレベーター 7 3 を下降させ、フィルター 1 8 側に UV 硬化樹脂を 1 層分流し込み、UV 光を照射して 1 層分の樹脂層のリブ部 2 3 (あるいはウエル部

10 分) を硬化させる。エレベーター 7 3 の移動と UV 照射を繰り返して所定の層まで積層硬化させた後、ベース板 7 1 を含む積層体を UV 樹脂液から取り出し、未硬化部分を洗浄してベース板 7 1 を外しポストキュアしてリブあるいはウエル付きフィルターを得る。

この光造型による方法において、フィルター 1 8 を下にしてその上に閉

15 じられた形状のリブ部 2 3 あるいはウエルを光造形で形成する場合、これらの内部における未硬化の樹脂の排出が困難であり、内部の樹脂が表面張力で盛り上がるためにリブあるいはウエルの形状が乱れる可能性がある。このため、図 1 1 (b) に示したように、フィルター 1 8 を上にしてその下側に光造形によりリブ部 2 3 あるいはウエルを形成成長させる方法が好

20 ましい。この方法を行うための光造型装置は株式会社デンケンより S L P - 4 0 0 0 として装置が市販されており、また造型の製造受託を行っている。また、現在の光造型は主としてレーザー照射により光硬化性樹脂の硬化を行っているが、上記の場合には照射パターンは一律であり、フォトマスクを通して光照射を行い UV 樹脂を積層することも可能であり、造型時

間を短縮することができる。

- 5 第六の方法では、ウエルあるいはリブとフィルターとを熱接着で接合する。例えば、フィルター部分を加熱してウエルあるいはリブを非加熱の状態で接合させ熱接着させる。フィルター部分は熱伝導率の良い金属あるいはセラミックスで作製し、リブは熱可塑性の材料を成型加工で作製する。フィルターの端面を加熱材料と接合させ、熱導電性を利用してフィルターを加熱しウエルとリブを熱接着する。

- あるいは、電磁誘導加熱または誘電加熱を利用する。ここで使用されるウエルあるいはリブは、電磁誘導加熱あるいは誘電加熱で発熱しない低誘電率の材料である熱可塑性の樹脂で作製する。ここで使用される材料の誘電率は3.5以下であることが好ましい。具体的な樹脂材料としては、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメチルメタアクリレート樹脂、液晶ポリマー、ポリカーボネート、ポリアミド樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、シクロオレフィン、
10
15 ポリメチルペンテン、ポリアリレート、ポリサルホン、ポリエーテルサルホンなどが挙げられる。

- 上記のような樹脂材料を何らかの方法で成型してあらかじめウエルあるいはリブ形状にする。ウエルは、フィルターに載置する複数のウエルを一体に全て作製しておくことが望ましく、その方法としては射出成型、プレス成型または異型押し出し成型によって複数のウエル孔の空いた連続パイプを作製してパイプを輪切りにする方法、板にドリルなどの方法で孔を空ける方法などが挙げられる。
20

また、ここで使用されるフィルター材料は誘電加熱で加熱される材料が好ましく、誘電率が3.8以上であるものが好ましい。具体的には、例え

ば金、銀、ニッケル、銅、鉄、アルミニウム、チタン、シリコン、ステンレス、タングステン、モリブデンなどの金属；シリカ、アルミナ、チタニアなどの金属酸化物；SiNなどの金属窒化物；ソーダーガラス、ホウ珪酸ガラス、パイレックス（商標）、石英ガラスなどのガラスが挙げられる。

- 5 あるいは、樹脂材料に無機材料のフィラーを混合したものをを用いてもよい。

ウエルとリブとの間にフィルターを挟むなど、ウエルとリブとの少なくともいづれかとフィルターとを重ね、固定治具で固定し、あるいは樹脂ローラーなどで挟み込んで加圧して電磁誘導加熱あるいは誘電加熱させ、フィルター部分を発熱させてその熱によってウエルとリブとをフィルターに
10 熱溶着する。電磁誘導あるいは誘電加熱の周波数としては、30kHzから300MHzが利用可能であり、好ましくは1～100MHzである。

第七の方法では、フィルターとウエルを接着剤で接着する。予め接着剤をウエルの片側端面に塗布しておき、フィルターに貼り付け、必要に応じて加熱して接着する。あるいは、クラリアントジャパン LICOWAX
15 LPなどのワックスをウエルに塗布し、フィルターを加熱して塗布冷却する方法で接着する。

第八の方法では、フィルターのインサート成型によりウエルあるいはリブを作製する。インサート成型ではあらかじめ作成したフィルターを金型に挿入して、樹脂成型を行うことでフィルターと樹脂とを一体成型することが可能である。
20

第九の方法では、フィルターとウエルとをそれぞれ磁性材料を用いて磁力により結合させる。例えば、フィルターかウエルのいずれかに強磁性体を用い、対応するウエルあるいはフィルターを磁石で構成し、磁石で結合することによりフィルター付きのウエルとすることができる。強磁性体と

しては、ニッケル、鉄などが挙げられ、磁石としてはフェライト、サマリウムコバルト磁石、ネオジウム系磁石、アルミニウムコバルト系磁石などが挙げられる。

5 フィルターを磁石とする場合には、例えば平滑な銅、ニッケル、クロムなどの金と接着性の良い金属板の表面に、数十オングストロームの厚さで金蒸着を行い、次いでフォトリソを塗布した後にフィルターの細孔を形成する部分にレジストを残したパターンニングを行う。次いで無電解フェライトメッキを行い厚さ1～20 μm のフェライト層を形成した後、レジスト剥離液にてレジストを剥離し、最後に金蒸着層からフェライト層を剥
10 がす。このフェライトメッキは、例えば日本応用磁気学会誌 Vol122, No9, 1998 1225-1232, 日本応用磁気学会誌 Vol 24, No4-2, 2000, 515-517の条件に準じて行うことができる。

このようにフィルターを磁石として、例えば上述した電鍍ニッケルメッキによりウエルを作製し、両者を磁力により結合することでフィルター付き
15 ウエルが作製される。

また、リブを磁石とする場合には、例えばフェライト、サマリウム系あるいはネオジウム系の磁性粉を樹脂バインダーにて混合してシートとしたプラマグシート（例えば株式会社マグエックス社製のもの）などにレーザーにて厚さ0.3 mm～1 mm程度の孔を空けた後、上述したニッケルフ
20 ilterと磁石により結合してフィルター付きウエルとすることができる。

第十の方法では、機械的な嵌合によりウエルとフィルターとを結合させる。例えば、上述したニッケルの電気メッキ法により作製されたウエルのレジストを剥離する前に、さらにレジストを塗布パターンニングし、ウエル壁上面中心にウエルの幅よりも50 μm ～100 μm だけ幅が狭いテーパ

状のレジスト溝を設ける。この溝に、すずもしくは金などの軟らかい金属、あるいは樹脂によるメッキを行い溝を充填する。次いで、レジストを剥離液にて剥離して、ニッケルのウエルの上に高さが幅とほぼ同等のすず、金あるいは樹脂などの櫛形の凸部が形成された凸構造のウエルを形成する。

- 5 同時に、フィルター側にもレジストで同じ位置に、メス型となるような、上記の凸型と高さ、幅が同等でウエルの凸部よりも硬いニッケル、ポリイミド樹脂などの凹型形状を形成する。次いで、両者をロールなどで加圧することで機械的に嵌合して結合させてフィルター付きウエルを得る。また、逆にウエル壁上面に凹形状を設け、フィルター側に凸形状を設けるように
- 10 してもよい。

- 本発明のバイオチップでは、第一のフィルターをウエルの底部に設けるとともに、その上側（ウエルを介して反対側）に第二のフィルターを設ける構成であってもよい。第二のフィルターは、上述した方法により得られた底部にフィルターを有するウエル内にプローブ担持粒子を収納し、さら
- 15 に上述した方法により得られたフィルターを接着剤、磁力、機械的な嵌合、平滑面同士の平面接合、機械的なクランプにより接合する方法などにより設けることができ、これにより上下にフィルターを有するバイオチップを得ることができる。

- また、フィルターが各ウエルの底部に形成されたバイオチップは、例えば
- 20 ば次の方法で作製することができる。

(1) 図19(a)に示したように、フィルター18をコルゲート状にして、その凸頂部32と凹頂部34とを、側壁20を構成する適当なフィルムあるいはフィルターで接着して各ウエル16、16・・・を形成する方法

(2) 図19(b)に示したように、金属、あるいは樹脂製のフィルターを、プレス金型を用いて、所定の間隔に凹部を有する形状に成型してこの凹部をウェル16、16・・・とする方法、あるいはさらにその片側を別のフィルターあるいはフィルムを粘着剤、磁石や機械的な嵌合などの方法で接合して閉ざされた空間を有するウェルを形成する方法

(3) 図19(c)に示したように、ウェル16、16・・・の底壁22に、レーザー、プレス、フォトリソグラフィー等で貫通孔を穿設してフィルター18とする方法、あるいはさらにウェルの上をフィルターで粘着剤、磁石や機械的な嵌合により接合する方法

10 (4) 図19(d)に示したように、底壁22の無い、側壁20で形成されたものを作成し、その底部にフィルター18を接着する方法、あるいはさらにウェルの上をフィルターで粘着剤、磁石や機械的な嵌合により接合して覆う方法

(5) 金属、金属酸化物、金属/金属酸化物あるいは樹脂等をレーザー
15 による穿孔、機械プレスまたはフォトリソグラフィーする方法

本発明のバイオチップは、一体に形成された複数のウェルもしくは単一のウェルを有しており、このウェルにプローブ担持粒子が分散された分散液が収容される。ウェルに収納する粒子はフィルター細孔よりも大きい粒子径で、チップの粒子をフィルターの孔に静置させ光学検出する場合には、
20 プローブ担持粒子の粒子径とフィルターの細孔の孔径は、 $\text{粒子径} / \text{孔径} = 1.1 \sim 2.5$ であり、且つ、 $\text{粒子径} < \text{孔間隔} < \text{粒子径} \times 10$ 、より好ましくは $\text{粒子径} < \text{孔間隔} < \text{粒子径} \times 4$ である関係を有している。ここで、「孔間隔」とは隣接する各孔の間における孔が空いていない部分の最短距離のことである。

粒子径／孔径が1.1未満である場合、粒子が細孔に入り込み、細孔から粒子が脱離できない確率が高くなる。粒子径／孔径が2.5を超える場合、粒子を含む溶液をフィルターを介して濾過し、粒子をフィルター上に残した際に、粒子が孔上に位置せず、ランダムに、あるいは粒子同士が重なり合ってフィルター上に配列される確率が高くなる。粒子が細孔に入り込み脱離できなくなることをさらに防止するためには、上記の関係が、粒子径／孔径＝1.15～2.0であることがより好ましく、さらに好ましくは粒子径／孔径＝1.2～1.6である。

また、チップを分離精製用を使用する場合には、粒子の粒子径、フィルターの孔径および孔間隔は、粒子径＞孔径＋孔間隔／2である関係を満足するように設定される。この関係を満たしていると、粒子を含む溶液をフィルターを介して濾過し、粒子をフィルター上に静置させた際に、粒子がすべてのフィルター孔上に静置せず少なくとも1つおきの孔間隔で粒子が静置するために、少なくとも50%以上の間隔で粒子により塞がれないフィルター孔が存在し、この結果、濾過抵抗の上昇が防止される。

1 ウェルに収納する全粒子数は用途により異なり、分離分画用途の場合はフィルター細孔数の100倍～1／100倍、好ましくはフィルター細孔数の10～1／10倍の範囲内であり、検出・同定の場合は各プローブごとに粒子の絶対数で1～1000個、より好ましくは1～500個、さらに好ましくは1～200個である。1 ウェル内の粒子数が多いと、濾過に際して濾過抵抗が大きくなり濾過性能を低下させ、あるいはフィルターが破壊される。検出・同定に際して有意となる粒子数は1000個でも充分であり、それ以上は意味がなくむしろ濾過性を困難にする。

各ウェルへ収納するプローブ担持粒子の絶対数は、次の方法で制御する

ことができる。

すなわち、粒子溶液の投入時にフローサイトメーターで粒子を個別に制御しながらC C Dカメラなどで個々の粒子を実際にカウントしながら投入することにより制御することができる。あるいは、あらかじめ粒子溶液の粒子濃度を測定しておき、当該溶液内の粒子濃度と粒子の比重から粒子数を計算して、この結果から逆算した粒子溶液量をスポッター等で投入することで、近似の粒子数をセル部屋に投入することができる。また、複数回に分けて所定数の粒子をスポットし、スポットした粒子数をその都度カウントして不足量を算出し、不足量がゼロ近似になるまでスポットを行う方法も可能である。

ここで、粒子数は、ある程度の近似的な同一性があればよいが、その誤差範囲はC V値で20%以内であることが好ましく、より好ましくは10%以内である。

プローブを担持する粒子としては、フィルターの細孔径よりも大きな径をもつ粒子であれば特に限定されず、有機粒子、無機粒子、有機無機粒子、相転移ゲルなどのいずれも使用可能である。

有機粒子としては、具体的には、ブタジエン系、スチレン系、ジビニルベンゼン系、アクリロニトリル系、アクリレート系、メタクリレート系、アクリルアミド系、ベンゾグアナミン系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系およびフッ素系等のモノマーを、単独であるいは2種以上を組み合わせ用いたモノマー原料から、乳化重合あるいはサスペンション重合により得られた粒子を使用することができる。あるいは多孔質の均一孔を持つプレートから樹脂を押し出して粒子を作成する膜乳化などによる方法も可能である。これらの粒子は必要に応じて分級機にて粒子径を揃えること

も可能である。

また、重合時にあるいは重合後にフェライト等の磁性体を添加して得られたもの、あるいは特開平 10-83902 などの方法にて粒子をフェライトメッキしたもの、あるいはセルロース、デンプン、アガロース、ガラクトース等の天然物架橋ゲル、アクリルアミド等の合成架橋ゲルも使用する
5 ことができる。

これらの粒子径の粒子径分布は、CV 値で 10% 以内とすることが好ましく、より好ましくは 5% 以内である。CV 値が 10% を超える場合、粒子がフィルターの孔に入り込む確率が高くなる。

10 スチレン系の粒子については、例えば特開昭 57-168163 号公報に記載の方法により得ることが可能である。

また、磁性粒子は、例えば特開平 11-176622 号公報に記載の方法により得ることが可能である。

無機系の粒子としては、金属酸化物粒子、金属硫化物粒子、金属粒子を使用
15 することができる。

金属酸化物粒子として最も好ましいのは、シリカ粒子であり、市販の各種シリカ粒子を使用することができる。

また、市販されている各粒子が使用可能であり、例えば、イムテックス (商品名: JSR)、MC I ゲル (商品名: 三菱化学)、トヨパール (商品
20 名: 東ソー)、ダイソーゲル (商品名: ダイソー)、ショーデックス (商品名: 昭和電工)、サンスフェアー (商品名: 旭硝子)、PL-PEGA (商品名: Polymer Laboratories)、PL-CMS (商品名: Polymer Laboratories)、PL-PBS (商品名: Polymer Laboratories)、PL-DMA (商品名: Polymer Laboratories)、AM resin (商品名: Novabiochem)、P500 (商

- 品名：東レ)、トレパール(商品名：東レ)、テクポリマー(商品名：積水化成品工業)、MP、MRシリーズ(商品名：綜研化学)、ベルパール(商品名：鐘紡)、エポスター(商品名：日本触媒工業)、セルロースパウダー(チッソ、旭化成)、セファセル(商品名：アマーシャムフォルマシア社)、
- 5 セファロース(商品名：アマーシャムフォルマシア社)などが使用可能である。

- 前記粒子表面を、アミノ基、カルボキシル基、カルボジイミド基、エポキシ基、トシル基、N-サクシイミド基、マレイミド基、チオール基、スルフィド基、ヒドロキシル基、トリメトキシシリル基、ニトリル三酢酸基、
- 10 ベンゾスルホアミド基、ポリエチレンイミン基、四級アンモニウム基、オクタデシル基等の各種官能基、あるいはγ-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランなどにより表面修飾して、プローブ結合サイトとすることができる。

- また、これらの表面修飾に際して、粒子担持プローブと被検体との反応
- 15 の際の立体障害を低下させるために、炭素数10～100のアルキレン基の両端に官能基が結合した構造の化合物、例えば、エチレングリコールジグリシジルエーテル誘導体、N-ε-マレイミドウンデカニック酸、メルカプトプロピルトリメトキシシラン、カリックスアレン誘導体、液晶をスペーサーとして使用することができる。また、アミノ基、カルボキシル基、
- 20 チオール基などで修飾されたオリゴヌクレオチドもスペーサーあるいはスペーサー兼結合サイトとして使用可能である。

プローブを担持する粒子として、有機粒子を使用する場合、その粒子径は、0.02 μm～120 μmが好ましく、より好ましくは0.1 μm～60 μmである。粒子径が小さい場合にはハンドリング性に難点が生じ、

これらの粒子を捕捉するフィルターの作成が困難となり、またフィルター孔が小さいために被検体が目詰まりしやすくなる。また粒子径が大きい場合には、立体障害のために反応性が低下することがある。

また、必要に応じて粒子を多孔質または中空状にすることが好ましい。

- 5 これによって、粒子径が大きい場合であっても、重量による粒子の沈降に起因する被検体との反応性の低下を防ぐことができる。

- プローブを担持する粒子として、無機粒子を使用する場合、その粒子径は、 $0.1\ \mu\text{m} \sim 0.1\ \text{mm}$ が好ましく、より好ましくは $1\ \mu\text{m} \sim 0.05\ \text{mm}$ である。粒子径が小さい場合にはハンドリング性に難点が生じ、特に
10 フィルターの細孔による粒子の捕捉が困難となる。また粒子径が大きい場合には、沈降するために反応性が低下することがある。

また、必要に応じて粒子を多孔質にすることが好ましい。これによって、粒子径が大きい場合であっても、重量による粒子の沈降などを防止することができる。

- 15 プローブ担持粒子を各ウェルへ収納する方法としては、粒子にあらかじめ各ウェルに対応した各種のプローブを別途固定化しておき、これをスポッター等で対応するセル内に投入する方法が挙げられる。あるいは、プローブ結合サイトを表面に有する粒子をスポッター等で各ウェルに投入し、
20 次いで、所定のウェルに対応した、種類の異なるプローブをスポッターなどで対応するウェルに投入する方法を用いることも可能である。

前者の方法では、粒子にプローブを結合する方法として、市販されている各社の固相合成機を使用することができ、例えば、オリゴヌクレオチドの合成機、ペプチドの合成機、糖鎖合成機、コンビナトリアルケミストリーによる各種低分子化合物合成機などを使用することができる。固相法で

- は反応と分離のために担体としてシリカビーズやポリスチレンジビニルベンゼン粒子が使用されており、これらの固相合成担体ビーズとチップ10に収納する粒子担体を兼用することで、合成機で合成したプローブ担持ビーズをそのままチップ10にスポットして収納することが可能である。これら5の合成機、特にオリゴヌクレオチドの合成機は汎用に普及使用されており、現在では、例えば夕方に合成機をセットすれば、翌朝にはオリゴヌクレオチドを固定化した粒子を作成することもできるようになり、これをスポットするだけで任意のヌクレオチドをもつオーダーメイドチップを極めて短時間に作成することができる。
- 10 粒子に担持するプローブとしては、例えば、核酸、分子量500～100万のタンパク質、脂質、糖鎖、細胞、タンパク質発現細胞、アプタマー、ウイルス、酵素、分子量50～100万の、薬理活性を有するリード化合物、あるいは特定の生理活性作用を持つか、これを持つ可能性のある化学物質などを使用することができる。
- 15 このうち、分子量50～100万のタンパク質としては、具体的には、合成ペプチド、膜タンパク質、酵素、輸送蛋白、サイトカイン、リンフォカイン、IgAおよびIgEなどの抗体、各種抗原、あるいはルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン、グリーン蛍光タンパク質等の生物発光機能を有するものなどが挙げられる。
- 20 脂質としては、具体的には、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトーマンノシド、ウルシオール、各種のガングリオシドなどが挙げられる。
- アプタマーは、タンパク質、酵素、色素、アミノ酸、ヌクレオチド、成長因子、遺伝子発現調節因子、細胞接着分子、生物個体などと結合能力のある機能性核酸であり、具体的には、トランビンアプタマー、エラストー

ゼアプタマー、活性化プティンC、C型肝炎ウイルスのNS3プロテアーゼアプタマーなどが挙げられる。

分子量50～100万の、低分子リード化合物としては、具体的には、
基質、補酵素、調節因子、レクチン、ホルモン、神経伝達物質、アンチセ
5 ンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー等のリガンド、フェニ
ルピペリジン誘導体、スルホンアミド／スルホン酸誘導体、ステロイド、
プロスタグランدين誘導体などの医薬候補物質が挙げられる。

プローブ担持粒子は、プローブの種類を識別するためのプローブ識別情
報を与えるための少なくとも一種の識別手段を有することが可能である。

10 このような識別手段としては、プローブ担持粒子の色、形状および粒子径
が挙げられる。

これらの識別手段は複数を組み合わせてもよく、例えば色と粒子径、色
と形状、色と遺伝子配列などの組み合わせが可能である。識別手段を色と
するためには、粒子を染料、顔料、蛍光染料などで含浸着色させる。これ
15 らの染料、顔料、蛍光体、燐光体について、異なる吸収、発光波長を持つ
ものとその色濃度とを組み合わせることで、さらに多数のプローブ識別情
報を得ることが可能である。例えば、色の種類として2色、色濃度として
3濃度を用いることで9種類の識別情報を得ることが可能である。染色粒
子としては、例えば、JSRのIMMUTEXなどが使用可能である。ま
20 た、蛍光粒子は、Molecular Probes, Inc. の FluoSpheres fluorescent
microspheres として販売されているカルボキシル変性、スルホン酸変性、
アルデヒドスルホン酸変性、アミン変性粒子などが使用可能である。

これらの色識別情報は次のようにして検出される。まず、色標識された
粒子に光源を照射する。色素標識が蛍光体、燐光体である場合は、対応す

る蛍光あるいは燐光励起波長光源である必要がある。次いでCCDカメラ、光電子増幅管などで粒子からの蛍光あるいは燐光などを光学的に検出し、得られた検出情報を統計的に処理してプローブ識別情報を得る。

- 5 また、粒子径を識別情報とする場合には、あらかじめ粒子径の大きさを各プローブに対応して変えたものを用意する。これらの粒子径としては、検出感度の問題から、粒子径の差を $0.3\mu\text{m}$ 単位以上とすることが好ましく、より好ましくは $0.5\mu\text{m}$ 以上である。

- 10 このように、ウェル内に複数の識別可能なプローブ担持粒子を収納することで、1ウェルで同時多項目検出が可能となり、反応時間と操作工程が短縮する。また、複数のウェルを有するチップを用いてウェルの位置情報と複数の識別可能なプローブ担持粒子を組み合わせることで、例えばウェル数を100ウェル、識別可能なプローブ担持粒子の種類を100とすることで $100 \times 100 = 10,000$ 種類のプローブを収納するバイオチップを得ることが可能となる。

- 15 上述したような識別手段を有するプローブ担持粒子は、以下のように各ウェルへ収納される。

- (i) 全ての識別手段における識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウェルに収納されるとともに、各ウェルに収容された複数のプローブ粒子について、識別情報が同一である。すなわち、一つのウェルに色、粒子径などのプローブ識別手段が同じであり、色の種類、粒子径のサイズなどの識別情報も同一である複数の粒子が収納され、各ウェル間についても同じ粒子が収納されている。なお、識別情報が同一であることが予め判明している場合は、プローブ識別情報とプローブ識別工程は無視することも可能である。
- 20

(ii) 全ての識別手段における識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウェルに収納されるとともに、各ウェルに収納された複数のプローブ粒子について、識別情報が異なっている。すなわち、一つのウェルに色、粒子径などのプローブ識別手段が同じであり、色の種類、粒子径のサイズなどの識別情報も同一である複数の粒子が収納され、各ウェル間については、識別手段は同一であるが色の種類、粒子径のサイズなどの識別情報が異なる粒子が収納されている。

(iii) 少なくとも一種の識別手段における識別情報が異なっている複数のプローブ粒子が同一ウェルに収納されるとともに、各ウェルに収納された複数のプローブ粒子について、その全ての識別手段における前記識別情報の構成が同一である。すなわち、一つのウェルに、色、粒子径などのプローブ識別手段の少なくとも一つについて、色の種類、粒子径のサイズなどの識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が収納され、各ウェル間については、この識別情報の構成は同一である。

(iv) 少なくとも一種の識別手段における識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が同一ウェルに収納されるとともに、各ウェルに収納された複数のプローブ粒子について、その少なくとも一種の前記識別手段における前記識別情報の構成が異なっている。すなわち、一つのウェルに、色、粒子径などのプローブ識別手段の少なくとも一つについて、色の種類、粒子径のサイズなどの識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が収納され、各ウェル間については、この識別情報の構成が異なっている。

アッセイの内容に応じて、ウェルの数およびウェルに収納されるプローブ担持粒子の構成が適宜選択される。例えば、図26(a)に示したように単一のウェルに同一のプローブ担持粒子を収納する態様；図26(b)

に示したように単一のウエルに識別情報が異なるプローブ担持粒子を収納する態様；図26(c)に示したように複数のウエルに同一のプローブ担持粒子を収納する態様；図26(d)に示したように複数のウエルに識別情報が異なるプローブ担持粒子を収納するとともに、各ウエル間での識別情報の構成が同一である態様；図26(e)に示したように複数のウエルに識別情報が異なるプローブ担持粒子を収納するとともに、各ウエル間での識別情報の構成が異なる態様などを挙げることができる。

例えば、上述したプローブ担持粒子を収納したウエルに被検体を投入する際には、図27(a)のようにウエル16の上部開口から投入する他、
10 図27(b)のように容器12に收容した一被検体と各ウエル16の底部を接触するようにしてもよく、あるいは、図27(c)のように各ウエル16に対応する区画を有する容器12に区画ごとに異なる被検体を收容し、これに各ウエル16の底部を接触させることにより、各ウエル16ごとに異なる被検体を收容することも可能である。

15 <バイオチップキット>

本発明のバイオチップキットは、バイオチップと、バイオチップのウェルを収納し、あるいはバイオチップと接続する容器とを備えている。

容器の材質は特に限定されず、有機材料および無機材料のいずれも使用することができる。有機材料としては、具体的には、ポリエチレン、ポリ
20 エチレン酢酸ビニル樹脂、ポリエチレンビニル樹脂、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリブタジエン、ポリアクリロニトリル樹脂、ポリメチルメタアクリレート樹脂、AS樹脂(アクリロニトリルとスチレンの共重合体)、ABS樹脂(アクリロニトリル、ブタジエンおよびスチレンの共重合体)、AAS樹脂(アクリロニトリル、アクリル酸エステルおよびスチレンの共

重合体)、ポリカーボネート、ポリアミド樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、脂肪族ポリエステル、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、脂肪族ポリアミド、脂環式ポリアミド、シクロオレフィン、ポリメチルペンテン、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリアリレート、
5 ポリサルホン、ポリエーテルサルホン、ポリイミド、トリアセチルセルロース、セルロースアセテート樹脂、硝酸セルロース樹脂、エポキシ樹脂、ポリテトラフルオロエチレン、フッ化エチレンポリプロピレンコポリマー、テトラフルオロエチレンパーフロオロアルコキシビニルエーテルコポリマー、ポリクロロトリフルオロエチレン、エチレンテトラフルオロエチレン
10 コポリマー、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化ビニル、シリコーン樹脂などが挙げられる。

これらの有機材料の成形方法としては、例えば、射出成形、プレスレス成形、射出圧縮成形、射出プレス成形、圧縮成形、トランスファー成形、切削成型、光造形等が可能である。

15 無機材料としては、具体的には、ニッケル、銅、鉄、アルミニウム、チタン、シリコーン等の金属；シリカ、アルミナ、チタニア等の金属酸化物、ソーダーガラス、ホウ珪酸ガラス、パイレックス（商標）、石英ガラス等のガラスなどが挙げられる。

これらの無機材料は、プレス成型、板のエッチング、レーザー穴あけ、
20 サンドブラスト、樹脂もしくは金属容器への表面塗布などに例示される、成型あるいは表面処理加工などの各種方法により容器形状とすることができる。

また孔が形成されたプレート、あるいは孔が形成されていないプレートを用い、これらのいずれか一方または両方を複数積層して所定の容器とす

- ることができる。これらのプレートは、積層部分からの液体の漏れを防ぐために、積層する部分のプレート面同士が平滑である必要がある。そのために、プレートを研磨して平滑にするか、あるいはシリコンウエハーなどのように予め平滑であるプレートを使用する。これらの平滑なプレート同士を接合した場合は、接着剤などを使用しなくても非常に強固な接合を得ることができる。

プレートとしてシリコンウエハーを使用する場合、必要に応じて酸化膜を形成したものであってもよく、あるいは、プレートを積層した後に酸化してもよい。

- 10 このようなプレートを用いた容器は、例えば次のように作製する。まず、容器の底部用に、微小な空気入排出孔を有するプレートを用意する。空気入排出孔の深さを深くしたい場合は、必要に応じて最下層のプレートを複数枚積層する。その上に、容器を水平に切断したのと同等の形状を持つ平滑なプレートを、容器の穴が所定深さとなるように任意の数だけ積層する。
- 15 容器の穴の深さは、同等の形状であるプレートを複数枚積層することで任意に制御できる。容器の形状を深さ方向に制御したい場合、例えば段差のある穴形状としたい場合は、形状の異なるプレートを積層することで任意の穴形状とすることができる。

- 最上部に配置される容器の蓋には、液体あるいは空気圧の入排出用としてプレートに垂直に孔を開けたものを使用するか、あるいはプレート面に溝を切ったものなどを用意してプレート積層体の最上部に蓋をしてもよい。
- 20 また、積層体の最上部あるいは底部に位置するプレートには、光学的な検出を可能とするために透明なガラスなどの材料を使用することができる。

一般に、孔径が微小で孔の深さが深い、いわゆる高アスペクト比の孔の

作成は困難であるが、上記の方法により任意のアスペクトの孔を有する容器を作成することが可能となる。

上記の方法により、チップのウエルに対応した孔を有する容器とすることも可能であるし、複数のウエルに対して1つの穴を共有する容器とすることも可能である。

5

チップのウエルに対応するウエルを持つ容器とするためには、ウエル水平断面と同等の孔形状である断面を持つプレートで容器の孔の深さだけ積層する。

10 複数のウエルに対して1つの穴を有する容器とするためには、複数のウエルによる水平断面積をカバーする面積以上の孔径を有するプレートを、容器の孔の深さだけ積層する。

また、容器底部に孔を持つ容器は、前記したように、容器底部となるプレートとして、あらかじめ孔を空けたプレートを用いることにより得ることができる。容器底部に孔を設けることにより、例えば、バイオチップの
15 ウエルと容器とを接続した際に、バイオチップのウエルに圧力を掛け、容器底部の孔から容器の空気を排出することで、バイオチップのウエル内の液体を容器に移動させることができる。

容器底部の孔径は、孔径が大きい場合は容器の液が漏洩するため一定以下の孔径することが必要であり、その孔径は孔の深さあるいは孔と液体との親和性により決まるが、一般には $50\text{ }\mu\text{m}\sim 1\text{ mm}$ 、好ましくは $0.1\text{ mm}\sim 0.5\text{ mm}$ である。孔径が $50\text{ }\mu\text{m}$ 以下の場合、目詰まりおよび濾過抵抗が大きくなり、孔径が 1 mm 以上の場合には液体が漏洩する可能性がある。
20

バイオチップと容器とにより、相互に対応する同一径のウエル同士を連

結したバイオチップキットを構成することができる。この場合、ウエル同士を連結する接続部において、液体の移動上流側のウエルよりも下流側のウエルの断面積を大きくすることにより、接続部におけるウエルの位置合わせ誤差を最小にすることができる。

- 5 バイオチップと容器とは、接続部において凹／凸、凸／凹あるいは超平滑面同士の接合により接合することができる。これらのいずれかの接合方法により、液体が接合部から隣のウエルに漏洩することを防止することができる。

- また、バイオチップ同士を、上記と同様にして、接続部において凹／凸、
10 凸／凹あるいは超平滑面同士の接合により接合することもできる。

- バイオチップと容器、あるいはバイオチップ同士の連結により、相互のウエル間同士の溶液移動、いわゆる溶液の直接ウエル間フローダウン移動が可能となり、移動にシリンジなどの移動手段を要しないため、シリンジ壁への付着に伴う溶液の減少、汚染などを生じることがなく、また溶液移動に要する時間を短縮できる。
- 15

バイオチップと容器を接続したバイオチップキットは、例えば以下の方法で作製することができる。ここで例示する方法では、容器を、貫通穴を有するプレートと、穴が形成されていないプレートのいずれかを用いた複数のプレートの積層により形成する。

- 20 図15(a)に示したバイオチップキットは、次のようにして作製される。まず、シリコンウエハーのエッチングにより貫通穴が形成された、バイオチップ10と同等の厚さのプレート87aと、任意の厚さのプレート87bと、シリコンウエハーをエッチングして気体もしくは液体の入排出口、あるいは液体入排出口を形成したプレート87cを用意する。次いで、

プレート87c'の上にプレート87b'を、さらにプレート87a'を位置合わせしながら積層することによって、二段の段差を持つ穴が設けられた積層プレートを作製する。この積層プレートのプレート87a'の穴に、バイオチップ10の張り合わせ前の片側チップを挿入してバイオチップと容器が複合された片半分バイオチップキットを作製する。同様に、87a, 87b, 87cを同様に積層して積層プレートを作製し、さらにバイオチップ10の張り合わせ前の片側チップを挿入して、同様な片半分バイオチップキットを作成する。

次いで、プローブを結合した粒子を上記の片半分キット中のウェルに、
10 ウェルの開放面からスポットなどの方法で収納する。この粒子の収納された片半分キットを下に、もう一方の片半分キットを上にして、ウェル同士が相対するように接合する。これにより、容器とチップとが一体となったバイオチップキットが作製される。この際、あらかじめ設けられた位置合わせマークによって上下のキットの位置合わせすることにより、正確に位置合わせすることができる。
15

また、図15(b)に示したバイオチップキットのように、最外側の上下端面を広く形成したチップを用意して、バイオチップ10の上下端面と、シリコンウェハーをエッチングして貫通穴を形成したプレート87b(87b')の一端面とを張り合わせて積層してもよい。

20 図16(a)に示したように、容器の底部あるいは蓋部となるプレートに、光学検出用として、例えば石英ガラスなどで形成した平滑で透明なプレート94を用いることも可能である。光学検出は、フィルターに充填した粒子の反応を見るために行うが、同図のように構成することにより、底部あるいは蓋部からフィルターへの距離を最小限にすることができ、光学

系の開口率を向上することができる。但し、この場合、液体を収容する容器の容積が少なくなり、検体や洗浄液が収容不足となる可能性がある。その場合には、図 1 6 (b) に示したように、液体の入排出口 8 8 に、ポンプ 9 0 に接続されたチューブ 8 9 を取り付け、チューブ 8 9 を通して液体を循環させるか、あるいはキット内と上下のチューブ取り付け口の一定部分のみに液体を上下させ、チューブの一部をキット容器バッファーとして使用することで、容器の容積不足を解消することができる。

図 1 7 (a) に示したように、プレート 8 7 b (8 7 b') を複数枚積層することにより、容器容積を拡大することができる。また、図 1 7 (b) に示したように、プレート 8 7 b (8 7 b') の穴径を漸次変えて、容器内面に傾斜を付与することも可能である。この場合、入排出口 8 8 から容器内方へ向かって次第に容器径が大きくなるように、階段状に容器内面に傾斜を付与することで、バイオチップの各ウエルへ溶液を均等に入排出させることができる。

図 1 7 (c) に示したように、バイオチップ 1 0 のウエル 1 6 に対応する独立したウエル 9 1 を有し、これらのウエルに対応する孔 9 2 が底部に形成された容器を接続させることも可能である。この容器底部の孔 9 2 の直径は、孔の高さにもよるが、好ましくは 1 0 0 ~ 5 0 0 μm 、より好ましくは 1 5 0 ~ 3 0 0 μm である。孔径が 5 0 0 μm を超える場合、液体が容器底面から流出する可能性があり、孔径が 1 0 0 μm 未満である場合、加減圧時における抵抗が大きくなる。

このように容器にウエルを設けたバイオチップキットでは、粒子結合プローブにより検体中のターゲットを B/F 分離した後に、何らかの分離方法により粒子からターゲットを分離させ、次いで、上容器と下容器に差圧

を掛け、バイオチップ10のウエル16中のターゲットを下容器のウエル91に移動させることができる。差圧を各ウエルに均等に掛けるためには、上容器、下容器のいずれかは、バイオチップの各ウエルに共通した収容空間を有する容器とすることが望ましい。

- 5 容器の容積は、前述したように、穴を開けたプレートを任意の枚数だけ積層することで任意の容積に調整可能である。また、容器の底部あるいは蓋部の少なくともいずれかを透明プレートとして、検出の際に透明プレートを下部にして粒子をフィルター孔に充填させ、透明プレートを通して光学検出し、一方バイオチップのウエルに対応した容器のウエルへ、粒子に
- 10 トラップしたターゲット液を分離して移動させることも可能である。

図18(a)に示したように、バイオチップ10同士を、ウエルが対応するように接続することも可能である。また、図18(b)に示したように、各バイオチップ10の間に、これらのウエルに対応する孔93を有する容器を設けることも可能である。

- 15 容器内に多段に配置された各バイオチップの各ウエルに同一のプロープを有する粒子を入れて使用する場合、多段チップに収納されたプロープ付き粒子によるB/F分離によりB/F分離能力を向上させることができる。また、多段チップの一段目と二段目のそれぞれに異なるプロープを有する粒子を入れる場合は、いわゆる Two Step In Vitro Selection 用ツールな
- 20 どに使用することが可能である。

図12および図13は、本発明のバイオチップキットの一実施形態を示した上面図およびA-A'断面図である。図12および図13に示したように、バイオチップキット14は、容器12とバイオチップ10とを有している。

バイオチップ 10 は、側壁 20 で仕切られた複数のウェル 16、16・・・からなり、これらのウェル 16、16・・・には、例えば、担持するプローブの種類が各ウェル 16 ごとに異なるプローブ担持粒子が収納される。

ウェル 16 の底壁 22 は、フィルター 18 で形成されている。このフィルター 18 は、ウェル 16 に収納されたプローブ担持粒子を遮断するとともに、このバイオチップ 10 を用いて分離、検出等を行う被検体、各種の緩衝液、洗浄液、分離剤、ラベル剤、二次抗体、増感剤、蛋白質分解酵素、イオン化剤などを有する各種溶液を通過させる。

容器 12 の内部に導入されたこれらの各種溶液は、フィルター 18 を介して全てのセルへ入出できるようになっている。すなわち、これらの各種溶液は、フィルター 18 を介してウェル 16 と隣接する、チップ 10 と容器 12 との間隙で構成されるこれらの各種溶液の収納室 26 を介して、フィルター 18 から任意のウェル 16 へ入出できるようになっている。

あるいは、側壁 20 も同様にフィルター 18 で形成されていてもよく、この側壁に形成されたフィルター 18 を介して、隣接するウェル 16、16 間でこれらの各種溶液を行き来させることも可能である。この場合、底壁 22 を形成するフィルターと、側壁 20 を形成するフィルターとは互いに同質のもので連続して形成されていてもよく、それぞれ異質のフィルターで構成して構成した複合フィルターとしてもよい。

容器 12 とチップ 10 は、図 12 (a)、(b) に示したように、両者を同一材料から一体に形成するか、あるいは両者を接着して固定することにより、容器 12 の内部において、チップ 10 と容器 12 とを一体化してもよい。

あるいは、図 13 (a)、(b) に示したように、バイオチップキット 1

4を、それぞれ独立した容器12とチップ10の二体から構成して、チップ10が、容器12の内部に収納されるようにしてもよい。この場合、容器12は各操作時において常に同一である必要は無く、その単位操作に応じて当該容器および溶液収容容器を変更することも可能である。

- 5 上記のように構成されたバイオチップキット14では、各ウェル16に収納されたプローブ担持粒子は、そのウェル位置によりプローブの内容が特定され、複数のプローブをチップ上にコンタミすることなく収納することができる。

- これらのバイオチップ中に収容されたプローブ担持粒子溶液と被検体、
10 各種の緩衝液、洗浄液、分離剤、ラベル剤、二次抗体、増感剤、蛋白分解酵素、イオン化剤などを有する溶液は、プローブ担持粒子が収納されたウェル16、16・・・間を自由に行き来することができ、チップ10の構造、あるいは前記溶液の攪拌条件を適宜選択することにより、全てのウェル16、16・・・へ前記溶液を循環させることができ、前記溶液と、複
15 数の種類の粒子担持プローブとの接触あるいは反応の機会が与えられる。

チップ10と容器12との間隙で構成される溶液の収納室26へ、全てのウェル16、16・・・が、底壁22または側壁20を形成するフィルター18を介して直接に隣接していることが好ましい。

- この溶液収納室26は、例えば図12(a)、(b)のようにチップ10
20 の底部下面と容器12の底部上面との間隙で構成される他、図13(a)、(b)のように、それぞれ独立したチップ10と容器12との間隙で構成される。

このように構成することによって、前記溶液は、これを共通に収納する溶液収納室26から、攪拌と必要に応じて加減圧を行うことにより、1層

のフィルター18を通過して、それぞれ異種のプローブを担持した粒子を
収納する複数のウェル16、16・・・に並列的に到達して、並列的に接
触、反応が行われる。

さらに、特定のウェル16内で反応しなかった未反応の被検体は、さら
5 に攪拌あるいは加減圧により他のウェル16内に到達して接触、反応が試
みられる。このように各ウェル16、16・・・間で逐次的に未反応の前
記溶液とプローブ担持粒子との接触、反応が試みられる。

そして、溶液収納室26と各ウェル16、16・・・とが1層のみのフ
ィルター18を介して隣接しているため、圧力損失は最低限で済み、また、
10 溶液収納室26への到達と、各ウェル16におけるプローブ担持粒子との
反応が並列で行われるために接触、反応時間を最短にすることが可能とな
る。

さらに、フィルター18の細孔径と、その深さを適当な条件に設定する
ことで、圧力損失を極めて低減することが可能であり、前記溶液は、あた
15 かもフィルター18が無い一つのスペースを移動するかのように、プロー
ブ担持粒子を収納した全てのウェル16、16・・・と、前記溶液の共通
部屋を構成する溶液収納室26との間を自由に移動することが可能となる。

あるいは、第一のフィルターが底部に設けられるとともに、ウェルを挟
んで第一のフィルターとは反対側に第二のフィルターが設けられている構
20 造とすることも可能である。この例を図14(a)に示す。同図に示した
ように、このバイオチップの上部には第二のフィルターとして上側フィ
ルター18'が設けられている。この上側フィルター18'は、プローブ担
持粒子をウェル16内へ収納した後に取り付けられる。その取り付け方法
としては、前述したように接着剤、磁力、機械的な嵌合、平滑部同士の面

接合、機械的な加圧などが挙げられる。また図 1 4 (b) に示したように、
予め上容器 8 1 と下容器 8 2 のそれぞれにフィルター 1 8' と底面フィル
ター 1 8 を有するウエル 1 6 のいずれかを取り付け、上容器 8 1 と下容器
8 2 を接合した後に、粘着剤、磁石、クランプなどの機械的な加圧力によ
り取り付ける方法も可能である。本方法では、機械的な加圧力のセット／
リセットにより上側フィルター 1 8' と底面側フィルター 1 8 とを任意に
切り離すことが可能である。あるいは、図 1 4 (c) に示したように、上
容器 8 1 に底面フィルター 1 8 を有するウエル 1 6 を下容器 8 2 とは上下
逆さに取り付け、上容器 8 1 と下容器 8 2 とをウエル 1 6 同士が接合する
ように前記方法のいずれかで取り付けることも可能である。

また、図 1 6 (a) に示したように、ウエルの外周部と同一形状の貫通
穴を有する平滑なプレート 8 7 a と、それよりも小さい径の貫通穴を有す
るプレート 8 7 b とを積層し、穴の段差部分にチップを挿入し、さらにプ
レート 8 7 b の穴を塞ぐように、液体の入出孔を持つ透明プレート 9 4 で
蓋をした構造のキットも形成可能である。この場合、プレート 8 7 a、8
7 b は、例えばシリコンウエハーで形成し、また透明プレート 9 4 は、研
磨石英ガラスで形成することにより、平滑性を利用した界面接合で接着剤
を用いずにキットを形成することができる。

< バイオチップキットの操作方法 >

本発明のバイオチップキットの操作方法では、バイオチップのウエルに
収容されているプローブ担持粒子が分散された溶液と、容器内に収容され
ている、例えば被検体、各種の緩衝液、洗浄液、分離剤、ラベル剤、二次
抗体、増感剤、蛋白分解酵素、イオン化剤などを有する各種溶液とを接触
可能な状態にしてウエル内の溶液と容器内の溶液を循環させることによつ

て、両溶液を高効率に混合、拡散、反応、洗浄または分離することができる。

これらの両者の溶液を接触可能な状態にする方法としては、バイオチップを容器内の溶液中を上下に移動させて容器内の溶液と接触させる方法
5 (図20(a-1)→(a-3)、図20(c-1)→(c-3))、容器内の溶液を、ノズル86を介した加圧/減圧や、溶液の外部からの注入排出などによる方法で溶液界面を上下させることにより、ウエル内へ移動させて当該ウエル内の溶液と接触させる方法(図20(b-1)→(b-2)、図20(d-1)→(d-2))方法が可能である。

10 このように容器内の溶液を、加圧/減圧や、溶液の外部からの注入排出などの方法で増減して容器内溶液の界面を上下させることで、プローブ付き粒子をバイオチップ内に残留させた状態で、ウエル内の溶液が容器内の溶液と一体化され、ウエル内の溶液をウエル内外に移動させることが可能となる。この方法を繰り返すことにより、容器内の溶液とウエル内の溶液
15 とを高効率に混合、拡散、反応、洗浄または分離することができる。

あるいは、図20(e-1)～(e-5)に示したように、フィルター18'を取り付けた上容器81と、底部にフィルター18を有するウエル16を取り付けた下容器82とを接合し、上容器81と下容器82に加減圧および溶液の投入排出を行うノズル83、84を設けたものを用意し(図
20 20(e-1))、ノズル83を介して加減圧を行うことにより、この加圧力あるいは減圧力により上容器81内の溶液をウエル16内の溶液と接触させ、上容器81の溶液をウエル16内の溶液と混合させ図20(e-2)、さらに下容器82に移動させる(図20(e-3)。さらにノズル84を介して加減圧により溶液を容器外に排出する((図20(e-4))。また、ウ

エル内を別の溶液 8 5 で充填する ((図 2 0 (e - 5)) ことも可能である。

この場合、上容器 8 1 と下容器 8 2 の容積を同量とし、投入溶液量を上下の各容器容積より僅かに多くすることが好ましく、これにより下容器 8 2 に溶液を移動した場合に上容器 8 1 にも溶液を残すことができ、フィルター内に空気を噛ませることが無く加減圧力を最小とすることができる。

また上述したウエルの上下、溶液の移動に際して、移動は連続的に行なわず、途中で所定の時間停止するように、間欠的に移動させることが好ましく、あるいは、正方向の移動の途中、短時間負方向の移動を入れることが好ましい。この方法によりウエル内の粒子はフィルターに張り付かず、移動の停止あるいは負方向の移動によりウエル内を循環して、バイオチップ内の溶液と粒子との接触効率を最大限にすることができる。

<被検体の投入方法>

バイオチップの各ウエルには、同一または異なる被検体を投入することができる。各ウエルに同一の被検体を投入する場合、各ウエル上から各ウエルに同一の被検体をスポッターなどでスポット投入するか、あるいは容器内溶液を被検体として、前述した方法によりウエル内溶液と接触させ、ウエル内溶液と循環、混合、拡散、反応させることができる。

チップのウエル数が多い場合は、容器内の被検体を介する方法が好ましい。スポットによる逐次スポットではスポット時間が掛かり、並列スポットは多数のスポッターが必要となる。

また、各ウエルにそれぞれ異なる被検体を投入する場合、各ウエルから異なる被検体をスポッターなどでスポット投入するか、あるいはウエルごとに独立した容器に収容されたそれぞれ異なる被検体を、前述した方法によりウエル内溶液と接触させ、ウエル内溶液と循環、混合、拡散、反応さ

せることができる。

ここに用いられる被検体としては、各種の培養液、組織、菌、ウィルス、細胞、リンパ球、脂質、糖鎖、核酸、尿、血液、血清、血球、ヒト／マウスサイトカイン、セリン／スレオニン、キナーゼ、分子量50～100万のタンパク質である合成ペプチド、膜タンパク質、酵素、シグナル伝達蛋白、輸送蛋白、リン酸化タンパク質等の各種タンパク質、サイトカイン、リンフォカイン、IgAおよびIgE等の抗体、各種抗原、転写因子、分子量50～100万の低分子リード化合物、基質、補酵素、調節因子、レクチン、ホルモン、神経伝達物質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー等のリガンド、各種の医薬候補物質、生理活性を有するか、あるいは生理活性を有する可能性がある各種の化学物質などを挙げるができるがこれらに限定されるものではない。

また、競合的ハイブリダイゼーションあるいは競合的イムノアッセイ反応を使用する場合には、標的物質を含む被検体と共に標準物質を含む標識被検体を同時に併用して用いる。

また、被検体以外に、各ウェルに対応して異なる材料、例えば各種の緩衝液、洗浄液、ラベル剤、二次抗体、増感剤なども上述した方法により投入可能である。

<被検体中の標的物質とプローブとの反応方法>

本発明のバイオチップキットを用いた被検体中の標的物質とプローブとの反応方法では、以下の(1)～(3)の工程により反応を行う。

(1) バイオチップのウェルに、前述したいずれかの方法により特定の粒子をウェルに収納する工程。なお、この工程は、予めチップ作成時にチップ製造者にて調整されていても構わない。

(2) バイオチップのウェル内に、被検体を含む溶液を投入して、上述した操作方法に基づき、当該被検体と、全てのウェル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程。この工程では、例えばウェルを容器内溶液中で上下させるか、あるいは容器内溶液の界面を移動させることにより、容器内溶液とウェル内溶液とを一体化させ、被検体中の標的物質とプローブとの拡散（および反応）を行う。

(3) バイオチップの容器に収容された前記溶液中でウェルを上下させるか、あるいはバイオチップの容器に収容された前記溶液の界面を上下させることにより被検体中の標的物質とプローブとの反応を行う工程。この工程では、上述した操作方法に基づき、被検体とプローブとの反応を進行させる。

< B / F 分離方法 >

本発明のバイオチップキットを用いた B / F 分離方法は、上記の反応方法における (1) ~ (3) の工程と、以下の (4)、(5) の工程により行なう。

(4) 前記溶液の界面の高さを、ウェル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウェル内から除去する工程。

(5) 洗浄液をバイオチップのウェルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウェルに循環させて該バイオチップのウェル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウェル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程。

< 分画分離方法 >

本発明のバイオチップを用いた被検体中の標的物質の分画分離方法は、

上記の反応方法における（１）～（３）の工程と、以下の（４）～（６）の工程により行なう。

- （４） 前記溶液の界面の高さを、ウェル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検
5 体を各ウェル内から除去する工程。

（５） 洗浄液をバイオチップのウェルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウェルに循環させて、該バイオチップのウェル内外へ洗浄液を出し入れすることにより、プローブ結合標的物質以外の非標的物質を除去する工程。

- 10 （６） 前記バイオチップのウェル側部の下端に設けられた凹部、凸部または平滑部と、上端にこれと対応する凸部、凹部または平滑部を有する容器を嵌合させ、次いで分離剤溶液をバイオチップのウェルに投入し、これにより前記粒子から被検体中の標的物質を分離し、前記容器のウェルに移動させる工程。

- 15 以下、本発明の被検体の分画分離方法の一例について、図２１～２３に基づき具体的に説明する。最初に、バイオチップの各ウェル１６ごとに、それぞれ異種のプローブを担持した粒子を収納する。

- 次いで、図２１（ａ）、（ｂ）に示したように、バイオチップ１０の容器
12 内に、被検物質２５を含む被検体溶液を投入して、被検体と、全ての
20 ウェル１６内のプローブ担持粒子２４とが接触可能な状態とする。この際、ウェル１６内における溶液界面の高さは、側壁２０の高さを超えないことが必要である。

このように所定の界面高さとなるまで被検体を含む溶液を投入する方法としては、例えば以下の方法が挙げられる。第一の方法は、図１３に示し

たバイオチップキット14のように、チップ10と容器12が独立したものを
用いて、予め容器12に被検体溶液を入れておき、そこにチップ10
を下に移動させて浸漬して、フィルター18を介して各ウェル16内に被
検体溶液を進入させる方法である。この際に、フィルター18の圧力損失
5 がある場合は、チップ10と容器12とが相互に接する部分をシールして
フィルター18に加圧力あるいは減圧力が掛かるようにすることで、被検
体溶液をフィルター18を通過させて各ウェル16内に導くことができる。

第二の方法は、図12に示したバイオチップキット14のように、あら
かじめ容器12の底面と、フィルター18との距離を一定としたチップを
10 用いて、容器12の低壁もしくは側壁に形成した導入口から溶液収納室2
6を介して被検体溶液を投入する方法である。

被検体溶液はウェル開口部17から投入してもよく、この場合には、ス
ポッター等で各ウェル16ごとに均等量を投入することが好ましい。また、
被検体溶液を、例えば図21における42のような導入口を通して投入す
15 る場合は、当該導入口から加圧して被検体溶液を送り込むか、あるいは溶
液収納室26側を減圧にして被検体溶液を送り込む方法のいずれの方法も
可能である。

これらの方法により、被検体と、全てのウェル16内のプローブ担持粒
子24とを接触させることができる(図21(a))。ウェル16内のプロ
20 ーブ担持粒子と被検体溶液を混合、拡散、反応させる方法としては、例え
ば図12(b)および図13(b)のように側壁20がフィルター18で
形成されて隣接する各ウェルがフィルター18で仕切られている場合は、
被検体溶液を攪拌することで、各ウェル16内の溶液を入れ替えることが
できる。この攪拌方法としては、攪拌羽根の付いた攪拌機、音波あるいは

超音波による振動、空気や常磁性体の移動による攪拌など、既存の方法による攪拌が可能である。これらのうちで特に好ましいのは音波あるいは超音波による振動であり、容器 12 またはチップ 10 を振動させるか、あるいは振動子をチップ 10 内の被検体溶液中に入れる方法などいずれも可能である。この場合、振動の適用周波数は、プローブや被検体の種類により適宜調節することができ、100 Hz ~ 1 GHz が使用可能であり、好ましくは 1 kHz ~ 300 MHz である。この範囲の周波数では、インピーダンスが低く、対象物の損傷を最低限に抑えることができる。適用周波数が 100 Hz 未満では、攪拌能力が低く、適用周波数が 1 GHz を超えると、被検体あるいはプローブを損傷する可能性がある。また、図 13 のように容器 12 とチップ 10 が独立している場合には、チップ 10 を容器 12 内の溶液の界面から引き上げた後に容器 12 内の当該溶液を上述した方法のいずれかで攪拌し、次いでチップ 10 を容器 12 内の溶液に再度浸漬させる方法、あるいはチップ 10 を水平面で回転するか、あるいは上下移動することにより容器 12 とチップ 10 とを相対移動させる方法によって各ウェル 16 内の溶液を入れ替えることができる。ウェル 16 同士がフィルター 18 ではない側壁で仕切られている場合は、底壁 22 のフィルター 18 から溶液を溶液収納室 26 に導き、次にフィルター 18 を通して他のウェル 16 内に溶液を導くことにより溶液の入れ替えをすることができる。

あるいは、図 12、13 の何れのチップの場合も、導入孔 42 から加圧空気を導入して容器 12 内における被検体溶液の界面を押し上げることでよりウェル 16 内に被検体溶液を導入することが可能である。

次いで、図 22 (a) に示したように、被検体溶液の界面の高さを、ウェル 16 の底壁 22 の下面未満となるまで低下させて、プローブ担持粒子

24に担持したプローブと反応していない非標的物質を除去する。ここで、溶液界面の高さをフィルター18の底面以下にする方法としては、被検体溶液を、底壁22のフィルター18を介してポンプあるいは加減圧等により排出口44から容器12外へ、あるいは溶液収納室26へ移す方法が挙げられる。また、容器12とチップ10とが独立している場合には、容器12とチップ10とを相対移動させてフィルター18を上下させる方法、あるいはチップ10を、パイオチップ10と隣接する容器、あるいは独立した別の容器に移す方法が挙げられる。

上記では、片側が開放されたウエルを用いているが、図14のようなフィルターが対面したチップの場合には、ウエルからの粒子の漏れを懸念する必要が無い場合、液体面はウエルの高さを超えて任意に移動させることができる。

さらに、本操作の前後において、必要に応じて、各種の洗浄剤や各種の緩衝液、あるいは二次抗体などの薬液を投入しても良い。これらの投入方法は被検体の投入方法と同様に行うことができる。

次いで、図23に示したように、各ウエル16に対応する複数の収納ウエル52を備えた容器54を用意し、各ウエル16へ、上部の開口17から分離剤溶液を投入して、被検体の標的物質と反応したプローブ担持粒子からこの標的物質を分離して、容器54へ標的物質を移動させる。

この容器54は、図24に示したように、ウエル52の底面に微細な貫通孔53を設けた容器であってもよい。このように貫通孔を設けることにより、チップのウエル16と容器のウエル52との間に差圧を生成することができ、チップのウエル16内の液体を一括してフローダウン移動することができる。この一括したフローダウン移動によれば、各チップのウエ

ルから容器のウェルへの液体移動を、シリンジなどを介してウェルの数と同一回数行う方法と比べて、少ない移動回数で行うことができるとともに、シリンジなどによる汚染あるいは被検体物質のシリンジへの付着による減耗を防止できる。

- 5 この容器底面に形成した貫通孔の直径は、孔の高さにもよるが、好ましくは100～500 μm 、より好ましくは150～300 μm である。孔径が500 μm を超える場合、液体が底面から流出する可能性があり、孔径が100 μm 未満である場合、加減圧時における抵抗が大きくなる。

- 10 分離剤溶液は、スポッター等を用いてウェル開口17から、各ウェル16ごとに個別にあるいは各ウェル16へ一度に投入することができる。

- 15 標的物質を分離した溶液を移動させる容器54は、各ウェル16とそれぞれ対応した複数の標的物質収納ウェル52、52・・・を設けた容器54であれば特に限定されない。例えば、ウェル16、16・・・と略同一のサイズを有する標的物質収納ウェル52、52・・・を設けた容器54を、チップ10の直下に位置させて、分離剤溶液をウェル開口17から投入して標的物質を当該ウェル16内のプローブ担持粒子から分離し、その直下に位置する標的物質収納ウェル52へ収容することができる。

- 20 ウェル底部と上部にフィルターが存在する図14(a)、(b)、(c)の場合においても上述した方法に準じた工程にて行なうことができる。例えば図14(b)のチップの場合では、図20(e-2)、(e-3)に示したように、ノズル83、84を介して加減圧空気を出し入れすることにより、上容器81内の溶液をウェル16内の溶液と一体化させて、上容器81、下容器82に漸次移動させることができる。

上記の方法により分離分画された被検体は、次の反応工程の出発物質あ

- るいはアッセイのための精製体として使用することができる。特に質量分析計、ラマン分析計、表面プラズモン分析計、X線分析計、電気化学検出装置、水晶発信子マイクロバランス検出装置などの各検出装置に、分離分画された被検体を投入して、いわゆるラベル剤を必要としない分析方法により、被検体の内容を解析・同定することも可能である。

- これらの手段により解析するに際して、温度等の反応条件を変えるか、あるいは複数回の経時検出を行うことにより、いわゆるカイネティック (Kinetic) 解析を行うことが可能である。さらに、単に被検体の内容やプローブと反応したリガンドが存在するかどうかを解析するのみならず、
- 10 ウェル16内の各粒子ごとに内容を解析することにより、被検体に含まれる標的物質の濃度あるいは量を求めることができる。

<被検体の検出方法>

- 本発明の被検体中の標的物質の光学的な検出・同定方法では、前述した被検体中の標的物質とプローブとの反応方法、またはB/F分離方法と同様の工程を行った後、以下の(1)～(3)の工程を行う。
- 15

- (1) ラベル剤を投入し、プローブと標的物質にラベル剤を結合させ、その後未結合のラベル剤を洗浄除去する。
- (2) ウェル内の溶液を底部のフィルターを介してウェル内からウェル外に排出し、ウェル内の粒子をフィルターの細孔に位置させる。
- 20 (3) 粒子に担持されたプローブと被検体の標的物質との反応または相互作用を検出する。

なお、B/F分離工程は、いわゆるホモジニアス系のアッセイ方法の場合は省略することができる。

工程(1)のラベル剤としては、例えばラジオアイソトープ、有機蛍光

体、希土類などの錯体系の蛍光体、蛍光蛋白、燐光体、量子効果による発
光ナノ粒子、化学発光剤、酵素発光剤、金、銀のナノ粒子等が使用可能で
ある。

さらにこれらのラベル剤を結合した二次抗などの二次プローブ、あるい
5 はモレキュラービーコン法のための蛍光分子／消光分子、FRET
(Fluorescent Resonance Energy Transfer) 法のためのドナー、アクセプ
ター分子なども使用可能である。

工程(3)では、粒子ごとに、粒子のプローブ識別情報と、粒子に担持
されたプローブと被検体の標的物質との反応または相互作用の情報の双方
10 を検出することができる。また、各ウェルごとの粒子について、粒子に担
持されたプローブ識別情報を識別し、次いでプローブと被検体中の標的物
質との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の
状態情報に基づき、ウェル単位での相互作用情報を算出することができる。

以下、本発明の被検体の検出方法の一例について、具体的に説明する。
15 最初に、各ウェルごとに、それぞれ異種のプローブを担持した粒子を収納
する。本発明のバイオチップを被検体の検出に用いる場合、各ウェルにお
ける各プローブごとの粒子数は、好ましくは1～1000個、より好まし
くは1～500個、さらに好ましくは1～200個である。

次いで、バイオチップ10の容器12内に、被検体を含む溶液を投入し
20 て、当該被検体と、各ウェル16内のプローブ担持粒子とを接触させる(図
21(a)、(b))。

次いで、被検体溶液の界面の高さを、ウェル16のフィルター18の下
面以下となるまで低下させて、プローブ担持粒子24に担持したプローブ
と反応していない被検体を除去する(図22(a))。

これらの工程は、前述した被検体の分離分画方法での操作に準じて行われる。なお、未反応の被検体を除去する工程において、図 2 2 (b) に示したように洗浄液を導入して粒子の洗浄を行い、必要に応じて洗浄液の導入、攪拌、排出を繰り返して、プローブ担持粒子から未反応の被検体を除去することができる。

次いで、図 2 5 に示したように、バイオチップ内の溶液を、底面フィルターを通して排出し、ウェル 1 6 内の粒子を底面フィルター 1 8 の孔部分に位置させた後、各ウェル 1 6 ごとに、プローブ担持粒子と被検体との反応または相互作用を検出する。なお、実際にプローブ担持粒子をフィルター孔上に位置させた電子顕微写真を図 2 8 に示した。

従来のように溶液中でプローブ担持粒子と被検体の反応を検出する場合では、反応に寄与した粒子の一部あるいは全部を 1 つの被検体として検出・同定していたが、このように、溶液の界面の高さをフィルター 1 8 の下面未満となるまで低下させ、プローブ付き粒子をフィルター孔上に位置させた状態で検出を行うことにより、反応に寄与した粒子の全てを粒子 1 個ごとに検出・同定の対象とすることが可能であり、検出感度の向上を図ることができる。図 2 8 は、プローブ担持粒子をフィルター孔上に位置させた電子顕微写真である。

被検体の検出方法としては、通常行われている各種の方法が適用可能であり、例えば、ラジオアイソトープ検出、蛍光検出、化学発光検出、酵素発光検出、ラマン検出等が挙げられるがこれらに限定されない。

上記した検出方法により検出を行うに際して、温度を変えるか、あるいは複数回の経時検出を行うことにより、いわゆるカイネティック (Kinetic) 解析を行うことが可能である。さらに、単に被検体の内容やプ

ローブと反応したリガンドが存在するかどうかを解析するのみならず、ウェル内の各粒子ごとに内容を解析することにより、被検体に含まれるリガンドの濃度あるいは量を求めることができる。

また、蛍光発光、化学発光検出、などのいわゆる光学的な検出において
5 は、ウェルからなるチップを収納する容器から、このチップを取り出してチップ単独で励起光の照射、検出光の検出をすることが好ましい。チップを容器から取り出した場合は、励起光はチップ上面、下面のいずれからとも照射可能である。また、検出光もチップ上面、下面のいずれからとも検出可能となる。

10 容器からチップを取り出すことで容器のゆがみや容器に由来する自家蛍光発光の影響を無くすることが可能であり、また物体との距離が近くなるため、光学検出の際の開口数NA (Numerical Aperture) を大きくできる。

また、図16のように容器を透明とすることで、容器からチップを取り
15 出さずに励起光、検出光のいずれもチップの上下から取り出すことができる。この場合、図16の透明プレート94の厚さと、プレート87bの厚さをできるだけ薄くすることにより、NAを大きくできる。

また、図14(b)または(c)のチップでは、反応後検出のために上
20 フィルター付きの上容器81を取り外し、下フィルターに粒子が配列された下フィルター付きの下容器82について、上側開放面から光照射して検出を行うことも可能である。

上記の検出工程において、各ウェルごとに、粒子に担持されたプローブと被検体との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の状態情報に基づきウェル単位での相互作用情報を算出する場合につ

いて説明する。まず、各ウェルに収納されているプローブ担持粒子ごとに、
プローブと被検体との相互作用に関する情報を計測する。この計測を行う
手段としては、上記に記載した各種の方法が使用可能である。例えば、蛍
光検出の場合は、同一ウェル内に配列した各粒子に検出のためのUV光あ
5 るいは可視光などの励起光を照射して、その結果得られる検出光などの信
号をCCDカメラ、蛍光管などで検出する。この方法を粒子ごとに個別に
行ない、さらにこの検出操作を他のウェル内の粒子についても同様に逐次
行う。次にこれらの得られたデーターを各ウェルごとに累積処理して、ウ
ェル内の粒子数Nの各データーについて統計的な標準化処理を行なう。ま
10 た必要に応じてすでに存在する各種のデーターベースのデーターとの比較
参照を行い、当該データーの修正処理あるいは判定処理を行うことが可能
である。

この方法により、例えば従来のバイオチップにおけるウェルあるいはセ
ル単位での光学的な検出方法のように、1つのウェルあるいはセルが発す
15 る蛍光強度、蛍光スペクトルを測定する方法に比して、ウェル内の粒子プ
ローブの個数N個ごとの情報が得られるために情報量が多くなり感度が向
上し、あるいはN個の粒子プローブの情報の分布を統計的に処理すること
により、定量的な検出・同定が可能となる。

また、温度等の反応条件を変化させるか、あるいは複数回の経時検出を
20 行う、いわゆるカイネティック (K i n e t i c) 解析において、ウェル
内粒子ごとに、あるいは粒子の検出パターンを経時的にトレースすること
により、母数Nが多く信頼性の高い解析データーを得ることが可能となる。

本発明のバイオチップには、そのプローブとして核酸を粒子へ担持した
DNAチップの他、抗原および抗体等のタンパクあるいはこれらのタンパ

クと反応する化学物質を粒子へ担持したプロテインチップ、低分子化合物を担持し蛋白などとの相互作用をスクリーニングするチップ、糖鎖を粒子へ担持した糖鎖チップ、細胞を粒子へ担持した細胞チップ等も含まれる。

- これらのDNAチップ、プロテインチップ、糖鎖チップおよび細胞チップは、担体上に固定する各種のプロープによって、遺伝子機能解析；遺伝子発現解析；機能プロテオミクスあるいは構造プロテオミクス；機能セローム、構造セローム、疾病解析、各種感染症等の疾病の罹患状況を確認するための臨床検査；遺伝子多型の検出；テーラーメード医療あるいはケモセラピーと称される患者の遺伝子配列に応じた治療医薬の選定；核酸、タンパク質、細胞、あるいは糖鎖と化学物質の相互作用研究、オーファン受容体リガンド探索；トキシコゲノミクスと称される、医薬品開発のための薬理スクリーニングあるいは化学物質の安全性および毒性のスクリーニング；その他の各種スクリーニング等に応用することができる。また、特定の被検体と特定のプロープの組み合わせにより、免疫アッセイ、タンパク質-DNA、タンパク質-タンパク質等の相互作用アッセイ、蛋白、糖鎖、細胞-リガンドアッセイ、リセプターリガンドアッセイ、キナーゼ等の酵素アッセイなどの各種アッセイ系を組むことができる。

以下、本発明を実施例に基づき説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

20 [実施例 1]

電鍍によるフィルターとリブの作製

1. フィルターの作製

ステンレス基板（SUS304、寸法 120mm×120mm×厚さ1mm）上にレジスト THB-110N（商品名：JSR 株式会社製）をスピンコーターにて膜厚

5 $5\text{ }\mu\text{m}$ となるように塗布し、ホットプレート上にて 120°C 、5 分間プレベークを行った。プレベーク後、マスクアライナーM-3LDF（商品名：ミカサ株式会社製）を用いて 400 mJ/cm^2 の露光量で電気メッキしない部分を残すように所定のパターンを焼き付けた。現像液には PD523（商品名：JSR 株式会社製）を用いて現像を行った後、ホットプレート上にて 90°C 、5 分間ポストベークを行った。

次いで、pH を 4.0 から 4.5 に保ち、浴温度 50°C に維持したスルファミン酸ニッケル浴（浴組成：スルファミン酸ニッケル 60%液 700g/l、臭化ニッケル 5g/l、硼酸 35g/l、応力調整剤 1.5g/l、ピット防止剤 2.5ml/l）中にレジスト THB-110N でパターンニングした SUS 基板を投入し、7V の電圧で 1 A/dm^2 の電流密度となるように電圧電流を制御し、30 分間直流を印加して厚さ $5\text{ }\mu\text{m}$ 、最小孔径 $3\text{ }\mu\text{m}$ 、最小孔間距離 $7\text{ }\mu\text{m}$ のニッケル膜を得た。

電気メッキ後、電鍍試料をレジストストリッパ THB-S1（商品名：JSR 株式会社製）に 30 分間攪拌浸漬することによって、全てのレジストを剥離してフィルターを得た。

2. リブの作製

電鍍法によって得たニッケルフィルター上に、上記と同じ工程でリブを積み上げることによってリブ付きのフィルターが得られた。装置および電鍍条件は上記のフィルター作製条件とほぼ同じであるが、フィルターの厚さ $5\text{ }\mu\text{m}$ に対してリブの厚さは $50\text{ }\mu\text{m}$ が得られるように、レジストを THB-220N（商品名：JSR 株式会社製）を用いてスピンコーターで塗布し、 650 mJ/cm^2 の露光量で露光した。また、厚さ $50\text{ }\mu\text{m}$ のニッケルメッキ膜を得るためにニッケルメッキを 5 時間行った。

[実施例 2]

酸化膜付きシリコンウェハーのエッチングによるフィルターとリブの作製

1. フィルターの作製

レジスト IX1170G (商品名: JSR 株式会社製) を、スピナー (クリーン
5 ントラック MARK8 (商品名): 東京エレクトロン社製) を用いて 6 イン
チ酸化膜付きシリコンウェハー (厚さ $2\text{ }\mu\text{m}$) 上に 3300 rpm で 30
秒間スピコートし、ホットプレート (クリーントラック MARK8 (商品
名): 東京エレクトロン社製) で 90°C 、60 秒間乾燥して膜厚 $0.86\text{ }\mu\text{m}$
10 のレジスト膜を得た。このレジスト膜に縮小投影露光装置 NSR-2205i12D
(商品名: ニコン社製、 $\text{NA}=0.57$ 、 $\text{シグマ}=0.60$) を用いて $0.4\text{ }\mu\text{mC/H}$ 1000 msec 、 $0.8\text{ }\mu\text{mC/H}$ 580 msec の露光量で露光した後、現像液
PD523AD (商品名: JSR 株式会社製) を用い、 23°C で 1 分間パドル現像し
た。次いで 20 秒間水洗し、乾燥してレジストパターンを得た。

レジストパターンを施した厚さ $2\text{ }\mu\text{m}$ の酸化膜付きシリコンウェハーに、
15 プラズマエッチング装置を用いて CF_4 プラズマを RIE モードで照射した後、
 O_2 プラズマでレジストを除去して酸化膜にフィルター孔径の直径と孔間の
スペースが $0.4/0.8\text{ }\mu\text{m}$ 、 $0.8/0.8$ 、 $2.8/1.0$ 、 $2.8/2.0$ 、 $2.8/2.8$ 、 $2.8/4.0$ 、 $4.0/1.0$ 、 $4.0/2.0$ 、 $4.0/4.0$ 、 $4.0/6.0$ 、 $4.0/8.0$ 、 $8.0/2.0$ 、 $8.0/4.0$ 、 $8.0/6.0\text{ }\mu\text{m}$ で、高さ $2\text{ }\mu\text{m}$ の孔が形成
20 されたフィルターを得た。

2. リブの作製

フィルター加工を施した面とは逆側の面に、レジスト (THB-151N) をス
ピナー (スピンコーター 1H-DX2 (商品名): ミカサ株式会社製) を用い

て、1700rpmで20秒間スピンコートし、ホットプレートで120℃、5分間乾燥して膜厚40μmのレジスト膜を得た。このレジスト膜に等倍投影露光装置 MA-150CC(商品名:ズースマイクロテック社製)を用いて露光した後、現像液 PD523AD(商品名:JSR 株式会社製)を用い、23℃で90
5 秒間パドル現像した。ついで30秒間水洗し、乾燥してレジストパターンを得た。

レジストパターンを施した酸化膜付き厚さ440μmのシリコンウエハーに、プラズマエッチング装置を用いて SF₆ プラズマを RIE モードで照射した後、O₂ プラズマでレジストを除去してシリコンに高さ440μm、直
10 径500μmの孔が形成されたウエルを持つシリコンウエハーを得た。これをダイシングソーにて切断し、10mm角にウエルが28個存在するチップを作成した。

[実施例3]

牛血清をPBS (Phosphate Buffered Saline) で10倍希釈した溶液を用意した。実施例2で得られたフィルター孔径4.0μmで孔間隔が2.0μmのチップを用い、図16(b)の容器にチップをセットし、上側蓋にチューブをセットして、チューブの別の端面に牛血清希釈液を入れたタンクを接続し、タンクの高さを差圧4gf/cm²と18gf/cm²になるようにセットして、牛血清希釈液をチップ容器のフィルター部に流し、
20 下容器の下蓋から牛血清希釈液を排出した。各時間における合計の吐出量と吐出時間との関係を図30に示した。

同図に示されるように、フィルターからの吐出量はほぼ一定であり、評価時間中は目詰まりを起こすことがなく、また破壊することもなかった。

[実施例4]

実施例 3 とはチップの孔径と孔間隔が異なる 8 種類の組み合わせについて、差圧 18 g f / cm^2 で実施例 3 と同様の試験を行った。その結果を図 3 1 に示した。なお、同図において、 a / r はフィルターの開口率を示す。試験の結果、同図の領域 A（開口率が 10 % 未満）ではフィルターが詰まり易く、領域 B（開口率が 60 % 超）ではフィルターが破壊された。このように、開口率が 10 % ～ 60 % のものでは目詰まりと破壊が生じなかった。

請求の範囲

1. 均一な孔径を有するストレートな細孔が均一な孔間隔で形成された
5 フィルターが底部に設けられたウエルを備えることを特徴とするバイオチップ。
2. 前記フィルターの厚さが $1 \sim 10 \mu\text{m}$ であることを特徴とする請求
項 1 に記載のバイオチップ。
3. 前記フィルターの開口率が $15 \sim 60\%$ であることを特徴とする請
求項 1 または 2 に記載のバイオチップ。
- 10 4. 前記フィルターの表面材質がシリカ、チタニアまたはアルミナであ
ることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のバイオチップ。
5. 一体に形成された複数の前記ウエルを備えることを特徴とする請求項 1
～ 4 のいずれかに記載のバイオチップ。
6. 単数の前記ウエルを備えることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれ
15 かに記載のバイオチップ。
7. 前記ウエルにおけるフィルターの上面側または下面側に補強用リブ
部が設けられていることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のバ
イオチップ。
8. 前記補強用リブ部が、複数の貫通孔が形成された一体形状であるこ
20 とを特徴とする請求項 7 に記載のバイオチップ。
9. 前記補強用リブ部が、前記フィルターと直接に接合されていること
を特徴とする請求項 7 または 8 に記載のバイオチップ。
10. 前記補強用リブ部が、前記フィルターと同一材料で連続形成され
ていることを特徴とする請求項 7 または 8 に記載のバイオチップ。

- 1 1. 前記ウエルの底部に、その周縁から所定の幅で、フィルターの細孔が形成されていない無孔部が設けられていることを特徴とする請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載のバイオチップ。
- 1 2. 第一のフィルターが底部に設けられるとともに、ウエルを挟んで
5 第一のフィルターとは反対側に第二のフィルターが設けられていることを特徴とする請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載のバイオチップ。
- 1 3. 前記ウエルに、プローブ担持粒子が分散された分散液が収容されていることを特徴とする請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載のバイオチップ。
- 1 4. 前記粒子の粒子径とフィルターの孔径との比率が、粒子径／孔径
10 $= 1.1 \sim 2.5$ であり、且つ粒子径 < 孔間隔 < 粒子径 $\times 10$ であることを特徴とする請求項 1 3 に記載のバイオチップ。
- 1 5. 前記粒子の粒子径、フィルターの孔径および孔間隔が、粒子径 > 孔径 + 孔間隔 / 2 の関係を満足することを特徴とする請求項 1 3 に記載のバイオチップ。
- 15 1 6. 前記ウエルに、プローブ識別情報を与えるための少なくとも一種の識別手段を有するプローブ担持粒子が分散された分散液が収容されていることを特徴とする請求項 1 3 に記載のバイオチップ。
- 1 7. 前記識別手段が、プローブ担持粒子の色、形状、粒子径および遺伝子配列から選ばれる少なくとも一種であることを特徴とする請求項 1 6
20 に記載のバイオチップ。
- 1 8. 全ての前記識別手段におけるプローブ識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、前記プローブ識別情報が同一であることを特徴とする請求項 1 6 または 1 7 に記載のバイオチップ。

- 1 9. 全ての前記識別手段におけるプローブ識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、前記プローブ識別情報が異なっていることを特徴とする請求 1 6 または 1 7 に記載のバイオチップ。
- 5 2 0. 少なくとも一種の前記識別手段におけるプローブ識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、その全ての識別手段における前記プローブ識別情報の構成が同一であることを特徴とする請求項 1 6 または 1 7 に記載のバイオチップ。
- 10 2 1. 少なくとも一種の前記識別手段におけるプローブ識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、その少なくとも一種の前記識別手段における前記プローブ識別情報の構成が異なっていることを特徴とする請求項 1 6 または 1 7 に記載のバイオチップ。
- 15 2 2. 請求項 1 ～ 2 1 のいずれかに記載のバイオチップにおける一体に形成された複数のウエルもしくは単数のウエルを収納するか、あるいは当該ウエルと接続される容器を備えることを特徴とするバイオチップキット。
- 2 3. 前記容器が、前記ウエルと一体に形成されていることを特徴とする請求項 2 2 に記載のバイオチップキット。
- 20 2 4. 前記容器が、前記ウエルと独立に形成されていることを特徴とする請求項 2 2 に記載のバイオチップキット。
- 2 5. 前記容器が、前記バイオチップのウエルに対応するウエルを有することを特徴とする請求項 2 2 ～ 2 4 のいずれかに記載のバイオチップキット。

26. 前記容器のウエル底部に貫通穴が形成されていることを特徴とする請求項25に記載のバイオチップキット。
27. 前記バイオチップと前記容器とが、対応するウエルが互いに連結するように接続されていることを特徴とする請求項25または26に記載のバイオチップキット。
28. 前記容器が、貫通穴が形成されたプレートと、貫通穴が形成されていないプレートの少なくともいずれかを用いて、複数の前記プレートを積層することにより形成されていることを特徴とする請求項22～27のいずれかに記載のバイオチップキット。
- 10 29. 請求項1～21のいずれかに記載の複数のバイオチップ同士が、対応するウエルが互いに連結するように接続されていることを特徴とするバイオチップキット。
30. 前記バイオチップのウエル側部の下端に設けられた平坦部と、別途の前記容器または前記バイオチップのウエル側部の上端に設けられた平
- 15 坦部とが、ウエルを互いに連結するように直接に接続されていることを特徴とする請求項22～29のいずれかに記載のバイオチップキット。
31. 前記バイオチップのウエル側部の下端に、別途の前記容器または前記バイオチップのウエル側部の上端に設けられた凸部と嵌合する位置合わせ用の凹部、あるいは別途の前記容器または前記バイオチップのウエル
- 20 側部の上端に設けられた凹部と嵌合する位置合わせ用の凸部が設けられていることを特徴とする請求項22～29のいずれかに記載のバイオチップキット。
32. 請求項1～21のいずれかに記載のバイオチップを製造するに際し、組成の異なる材質で形成された少なくとも2層からなるプレートにつ

- いて、片面側からパターンエッチングにより 2 層の境界までエッチングを行いウエル孔を形成するとともに、他面側からパターンエッチングにより 2 層の境界までエッチングを行いフィルター孔を形成し、これによりウエルとフィルターとが接合したバイオチップを得ることを特徴とするバイオ
- 5 チップの製造方法。
- 3 3. 請求項 1 ～ 2 1 のいずれかに記載のバイオチップを製造するに際し、シリコンウエハーをエッチングすることによりフィルター、リブおよびウエルをそれぞれ作製し、次いで、これらを積層することを特徴とするバイオチップの製造方法。
- 10 3 4. 容器がバイオチップのウエルと独立に形成されている請求項 2 2 ～ 3 1 のいずれかに記載のバイオチップキットの当該容器に收容された溶液中でバイオチップのウエルを上下させることにより、当該容器内の溶液と、ウエル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることを特徴とするバイオチップキットの操作方法。
- 15 3 5. 請求項 2 2 ～ 3 1 のいずれかに記載のバイオチップキットの容器に收容された溶液の界面を上下させることにより、当該容器内の溶液と、ウエル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることを特徴とするバイオチップキットの操作方法。
- 20 3 6. バイオチップを収納する容器を備える請求項 2 2 ～ 3 1 のいずれかに記載のバイオチップキットの当該容器とチップとの間、あるいは当該チップにおける相互のウエル間に差圧を生じさせ、これにより、ウエル内の液体とプローブ担持粒子との接触、液体のウエル間での移動、あるいはこれらの両方を行うことを特徴とするバイオチップキットの操作方法。
- 3 7. バイオチップを接続する容器を備える請求項 2 2 ～ 3 1 のいずれ

かに記載のバイオチップキットの当該容器とチップとの間、あるいは当該チップにおける相互のウェル間に差圧を生じさせ、これにより、ウェル内の液体とプローブ担持粒子との接触、液体のウェル間での移動、あるいはこれらの両方を行うことを特徴とするバイオチップキットの操作方法。

- 5 38. 前記容器内の溶液と、ウェル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることにより、バイオチップ内の内容物の混合、拡散、反応、分離または洗浄を行うことを特徴とする請求項34～37のいずれかに記載のバイオチップキットの操作方法。

- 10 39. 前記バイオチップの各ウェルに同一の被検体を投入することを特徴とする請求項34～38のいずれかに記載のバイオチップキットの操作方法。

40. 前記バイオチップの各ウェルに異なる被検体を投入することを特徴とする請求項34～38のいずれかに記載のバイオチップキットの操作方法。

- 15 41. 請求項22～31のいずれかに記載のキットにおけるバイオチップのウェルに、請求項18～21のいずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウェルに収納する工程；

前記バイオチップのウェル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウェル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；および

- 20 び

バイオチップの容器に収容された前記溶液中でウェルを上下させるか、バイオチップの容器に収容された前記溶液の界面を上下させるか、あるいは差圧を加えることでウェル内外の溶液を循環することにより被検体中の標的物質とプローブとの反応を行う工程を含むことを特徴とする被検体中

の標的物質とプローブとの反応方法。

4 2. 請求項 2 2 ～ 3 1 のいずれかに記載のキットにおけるバイオチップのウェルに、請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウェルに収納する工程；

- 5 前記バイオチップのウェル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウェル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；

前記溶液の界面の高さを、ウェル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウェル内から除去する工程；および

- 10 洗浄液をバイオチップのウェルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウェルに循環させて該バイオチップのウェル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウェル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程を含むことを特徴とする被検体中から標的物質を B/F 分離する方法。

- 15 4 3. 請求項 3 0 または 3 1 に記載のキットにおけるバイオチップのウェルに、請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウェルに収納する工程；

前記バイオチップのウェル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウェル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；

- 20 前記溶液の界面の高さを、ウェル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウェル内から除去する工程；

洗浄液をバイオチップのウェルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウェルに循環させて該バイオチップのウェル内外へ洗浄液

を出し入れさせ、洗浄液をウエル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程；および

- 前記バイオチップのウエル側部の下端に設けられた凹部、凸部または平滑部と、上端にこれと対応する凸部、凹部または平滑部を有する容器を嵌合させ、次いで分離剤溶液をバイオチップのウエルに投入し、これにより前記粒子から被検体中の標的物質を分離し、前記容器のウエルに移動させる工程を含むことを特徴とする被検体中の標的物質の分画分離方法。

- 4 4. 請求項 2 2 ～ 3 1 のいずれかに記載のキットにおけるバイオチップのウエルに、請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれかに記載のチップとなるように
- 10 特定の粒子をウエルに収納する工程；

前記バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；

- 前記溶液の界面の高さを、ウエル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各
- 15 ウエル内から除去する工程；

洗浄液をバイオチップのウエルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウエルに循環させて該バイオチップのウエル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウエル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程；

- 20 ウエル内の粒子をフィルターの細孔に位置させる工程；および

前記粒子に担持されたプローブと被検体の標的物質との反応または相互作用を検出・同定する工程を含むことを特徴とする被検体中の標的物質とプローブの相互作用の検出・同定方法。

- 4 5. 粒子ごとに、粒子のプローブ識別情報と前記粒子に担持されたプ

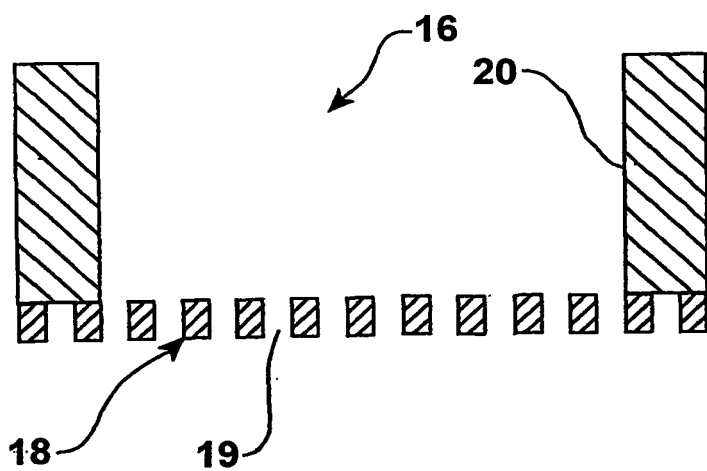
プローブと被検体の標的物質との反応または相互作用の情報の双方を検出することを特徴とする請求項 4 4 に記載の被検体中の標的物質の検出・同定方法。

- 4 6. 各ウェルごとの粒子について、前記粒子に担持されたプローブ識別情報を識別し、次いでプローブと被検体中の標的物質との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の状態情報に基づき、ウェル単位での相互作用情報を算出することを特徴とする請求項 4 4 に記載の被検体中の標的物質の検出・同定方法。

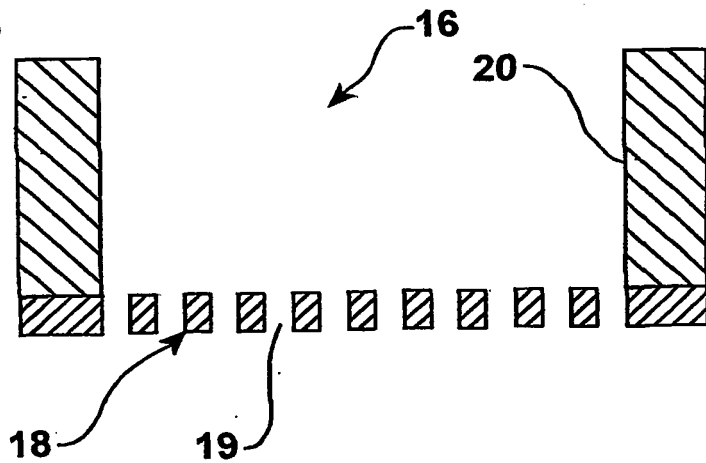
1/27

図 1

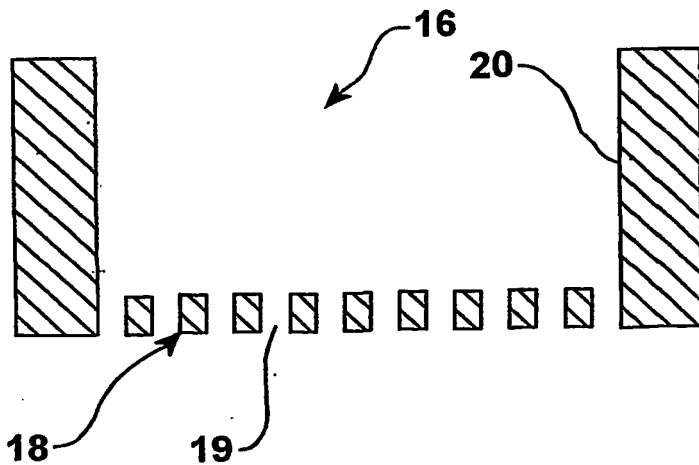
(a)



(b)



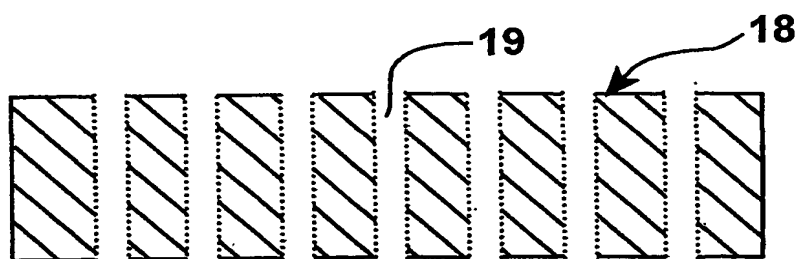
(c)



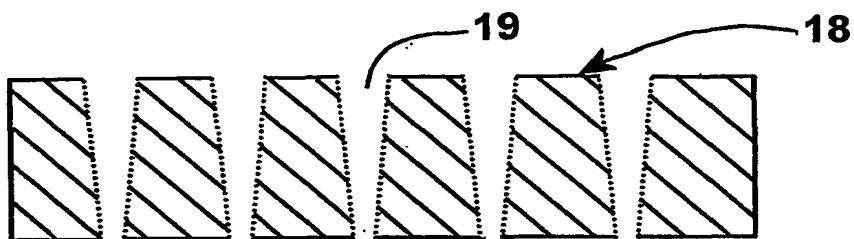
2/27

図 2

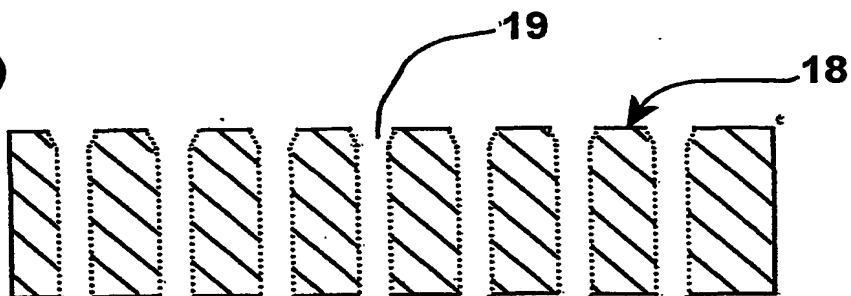
(a)



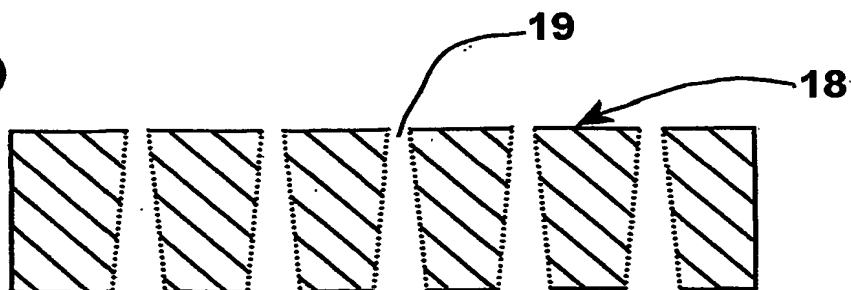
(b)



(c)



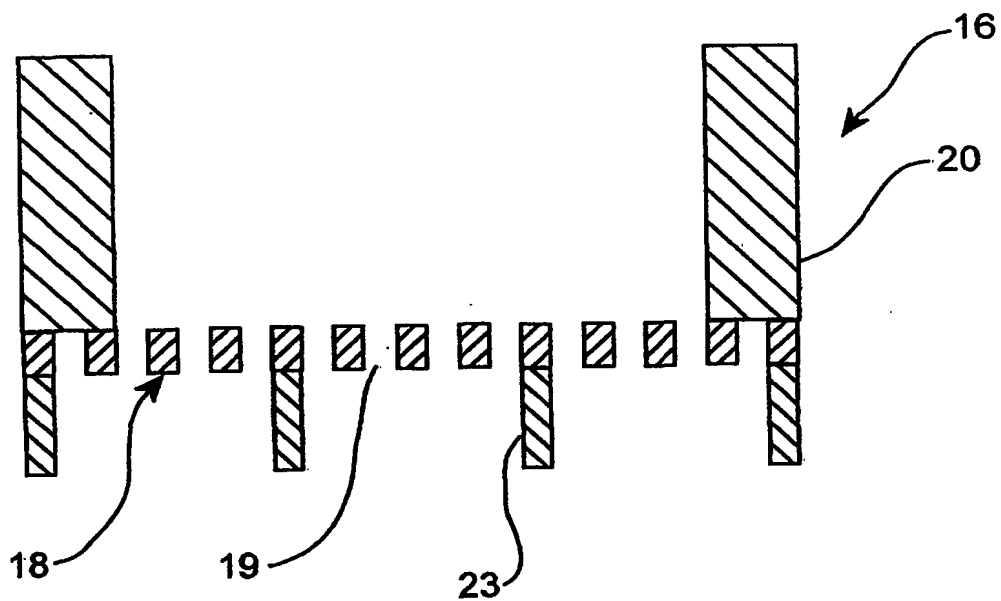
(d)



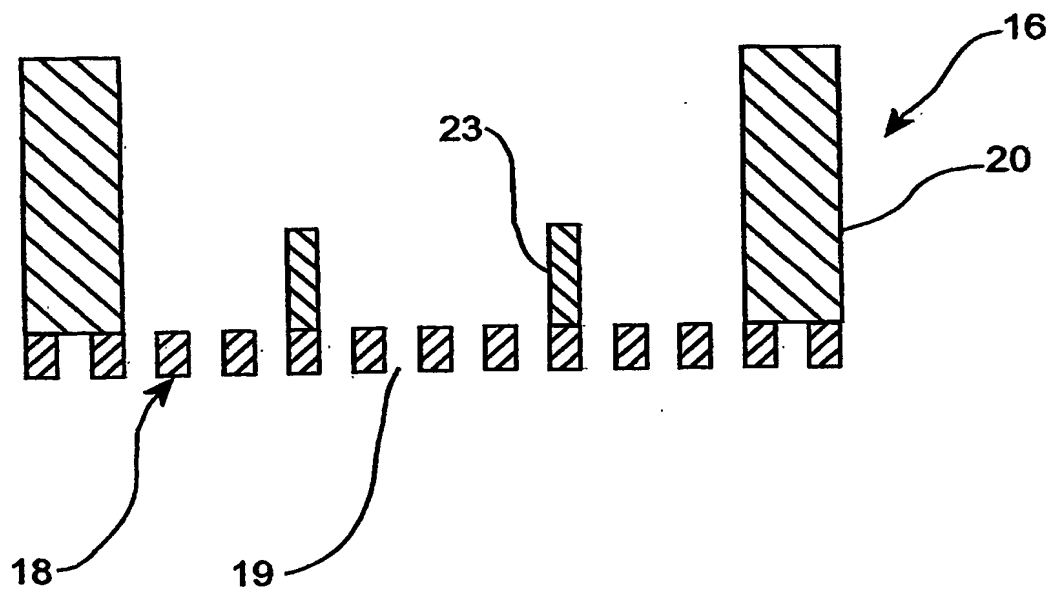
3/27

3

(a)



(b)



4/27

図 4

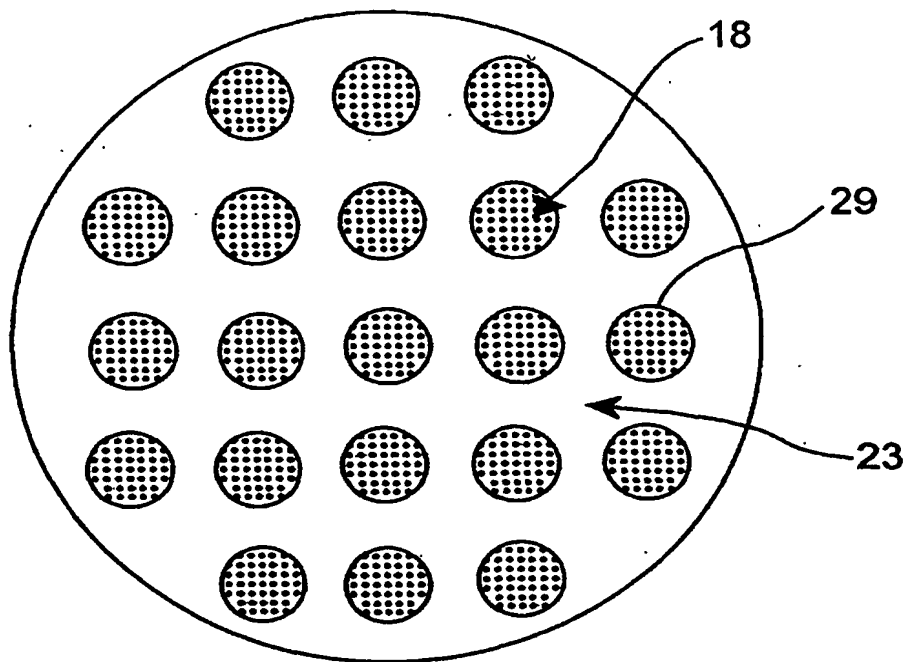
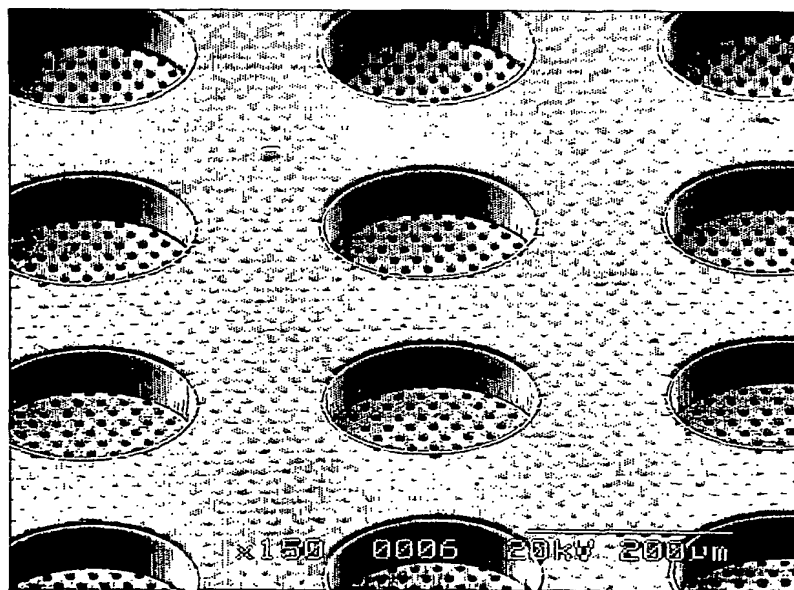


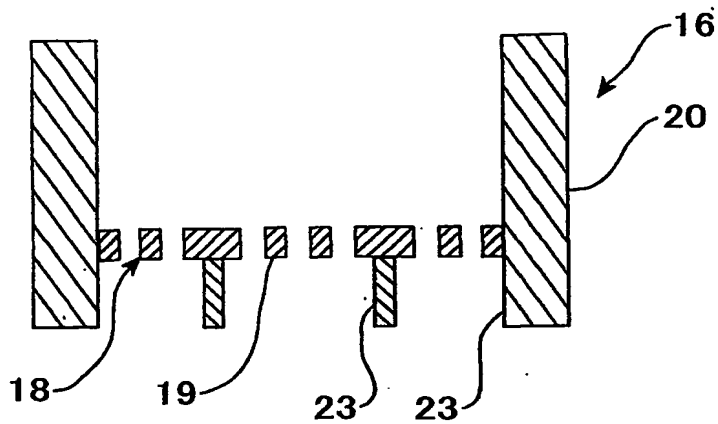
図 5



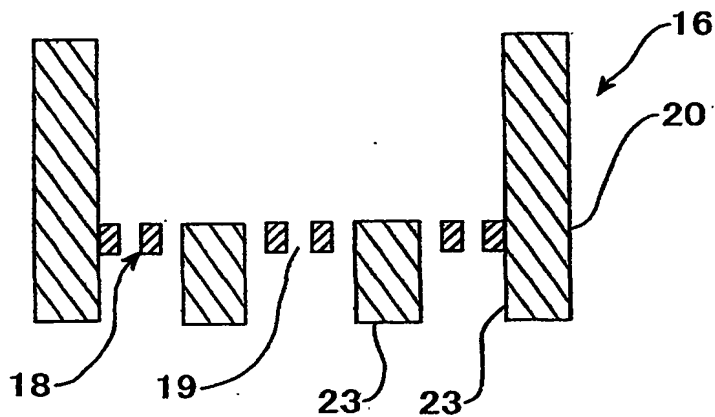
5/27

図 6

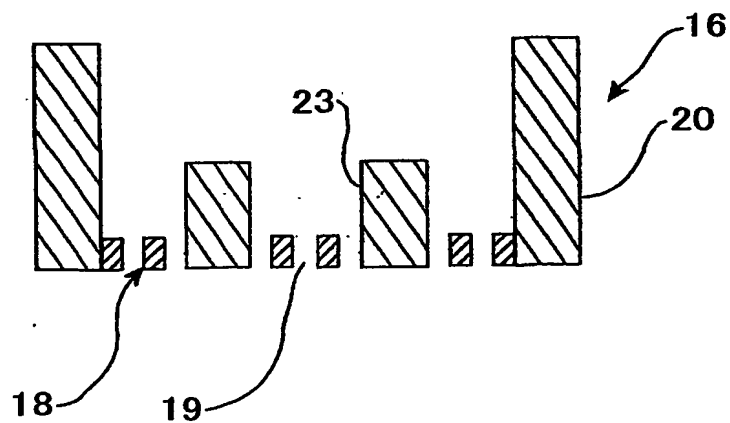
(a)



(b)



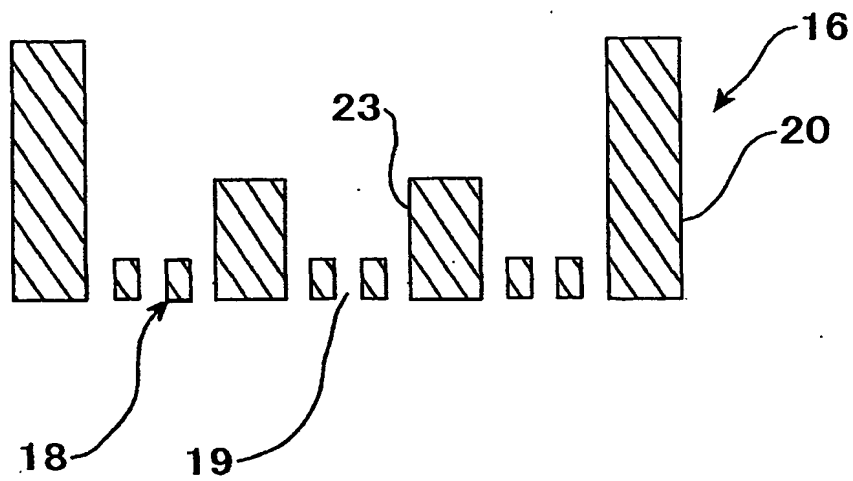
(c)



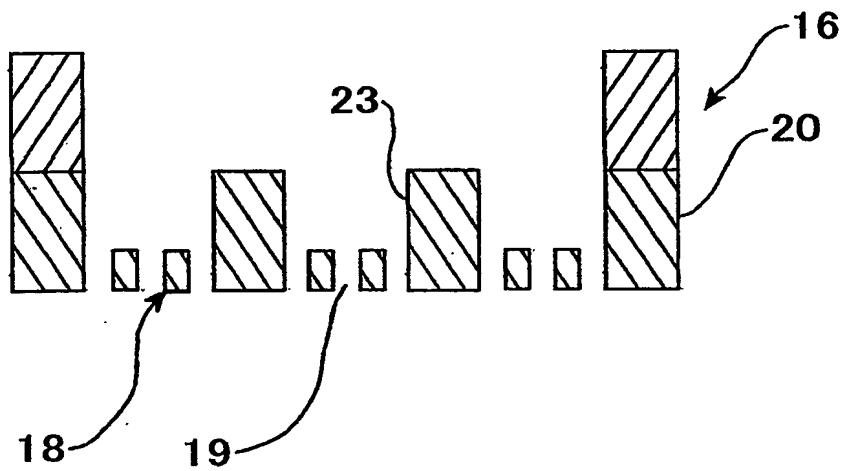
6/27

図 7

(a)



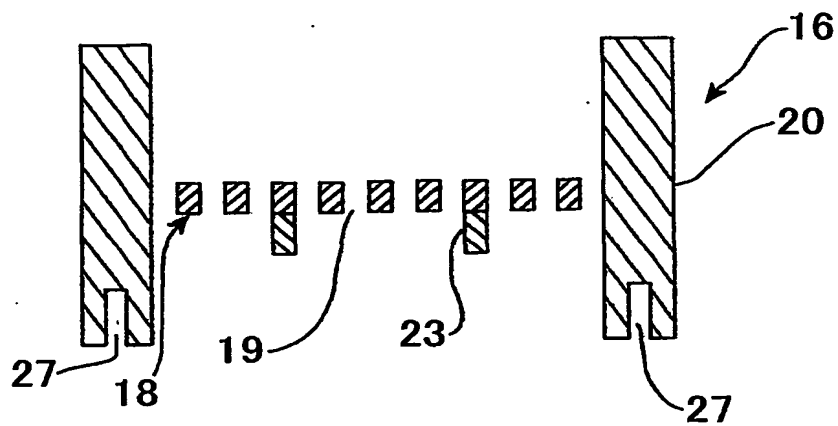
(b)



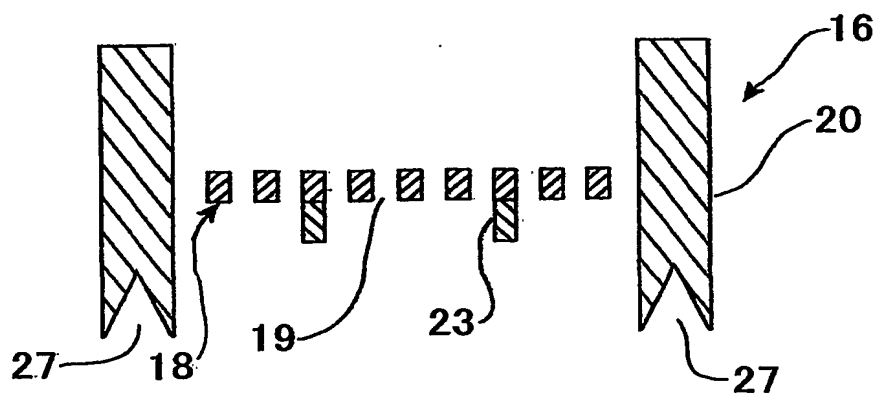
7/27

図 8

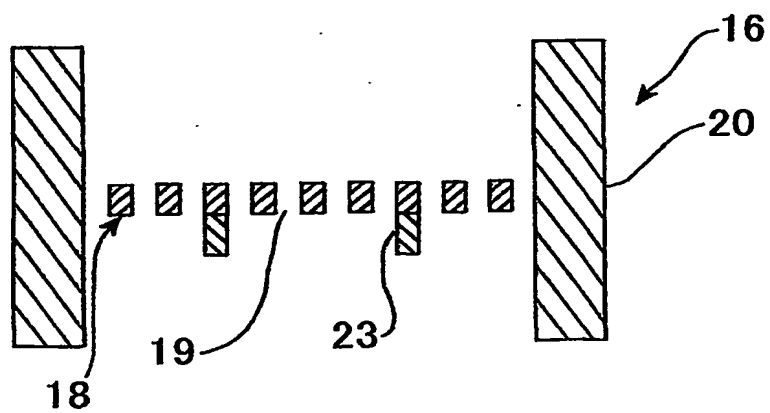
(a)



(b)



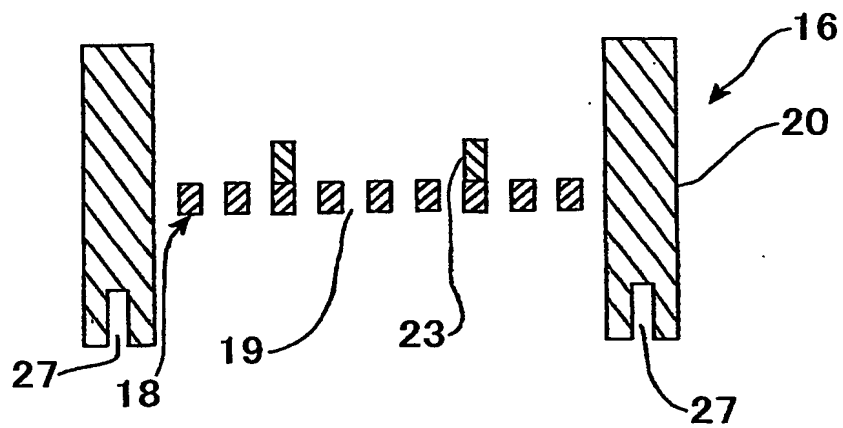
(c)



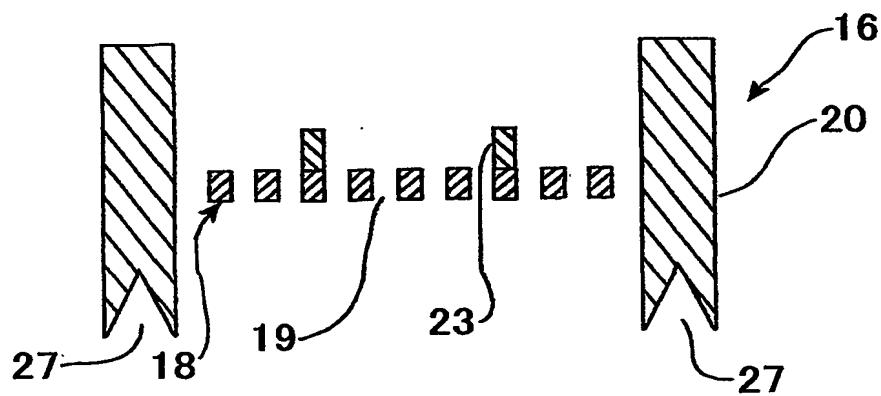
8/27

図 9

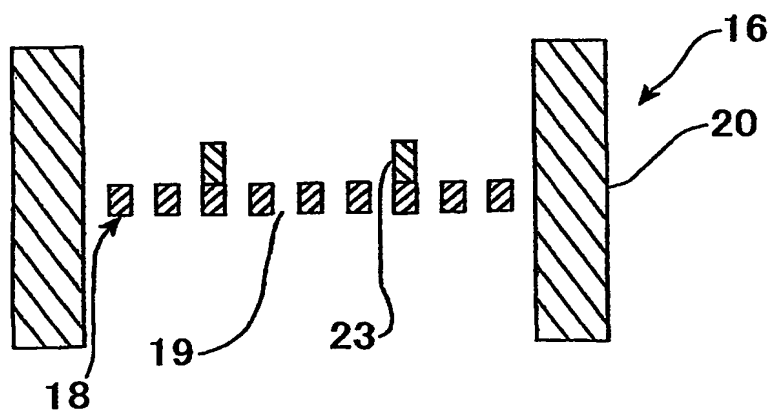
(a)



(b)



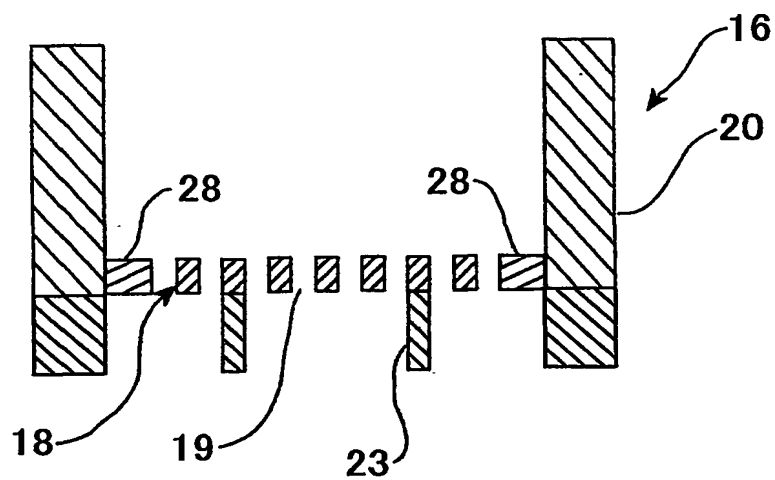
(c)



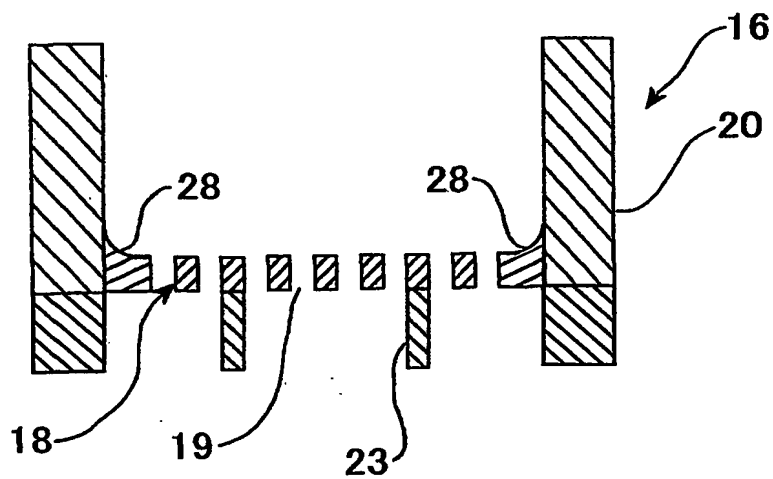
9/27

図 10

(a)



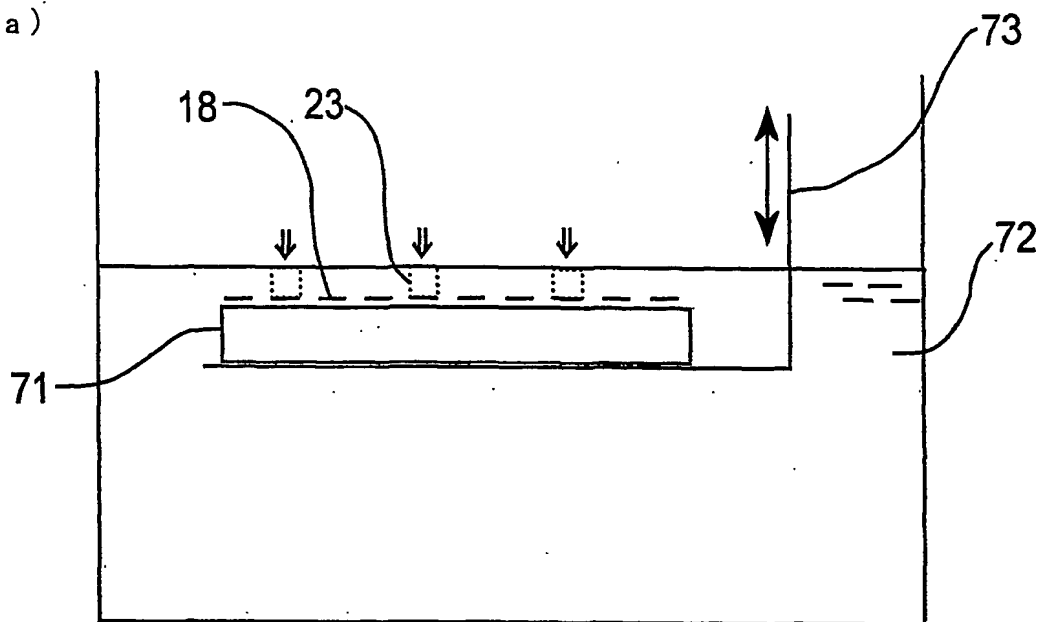
(b)



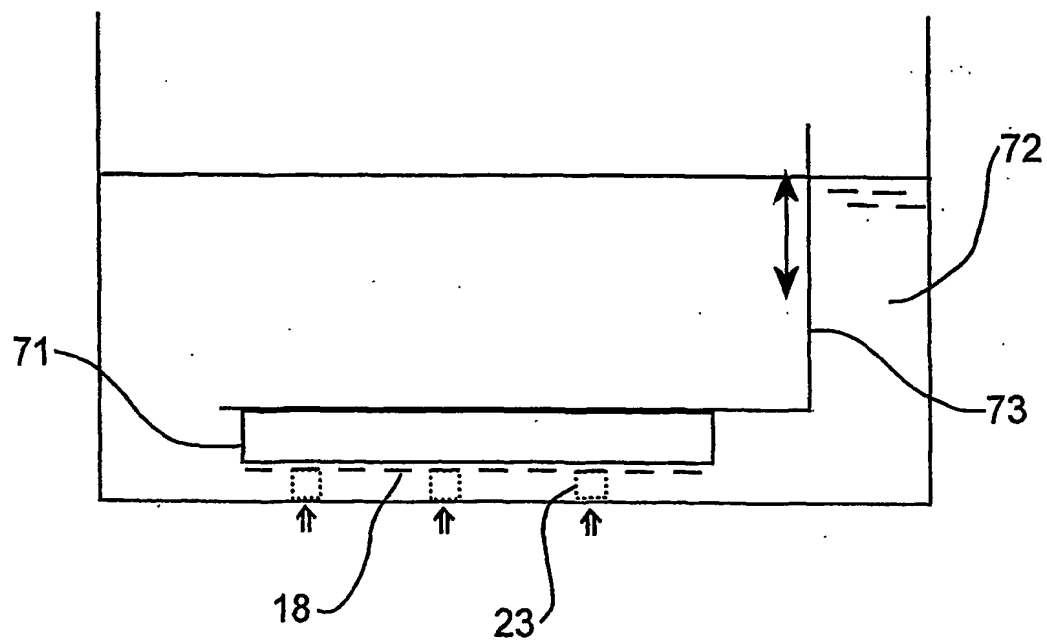
10/27

図 1 1

(a)



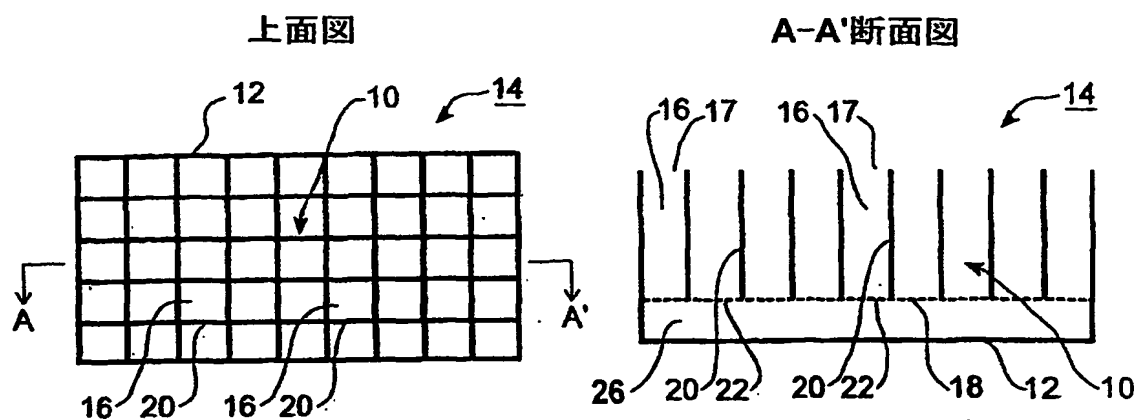
(b)



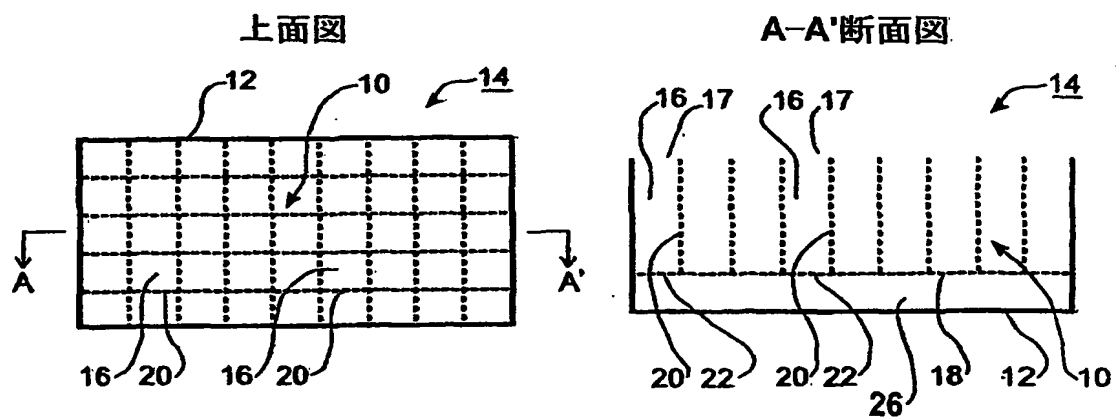
11/27

図 1 2

(a)



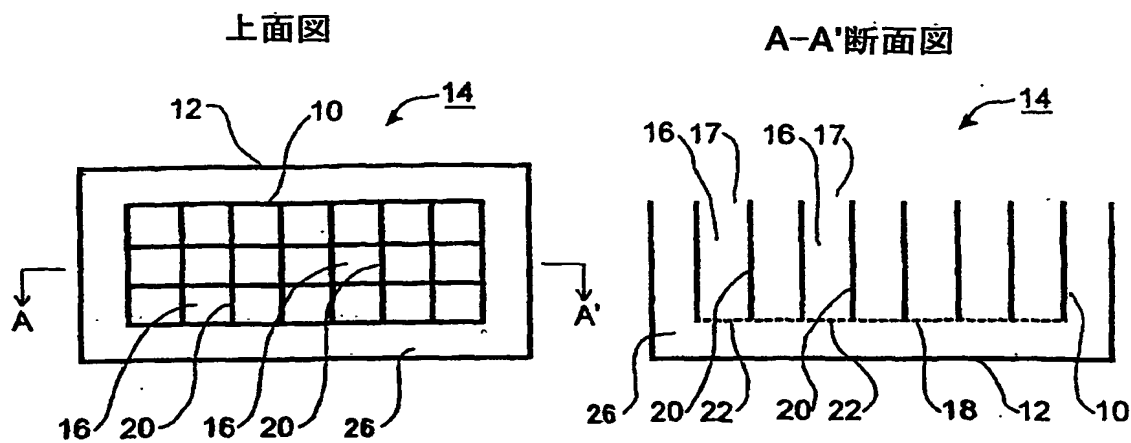
(b)



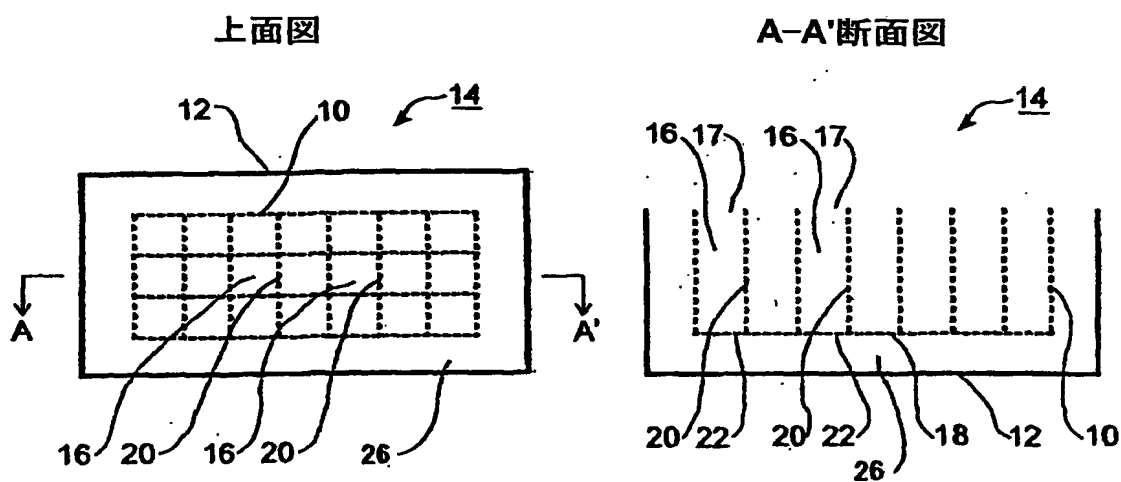
12/27

図 1 3

(a)



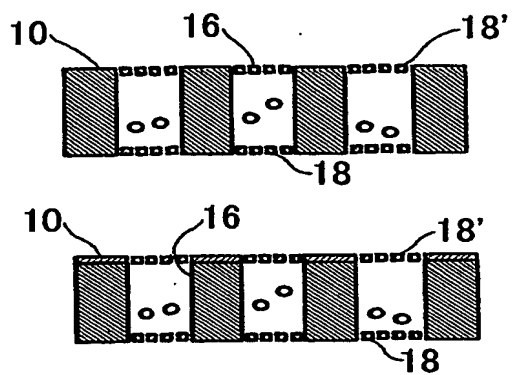
(b)



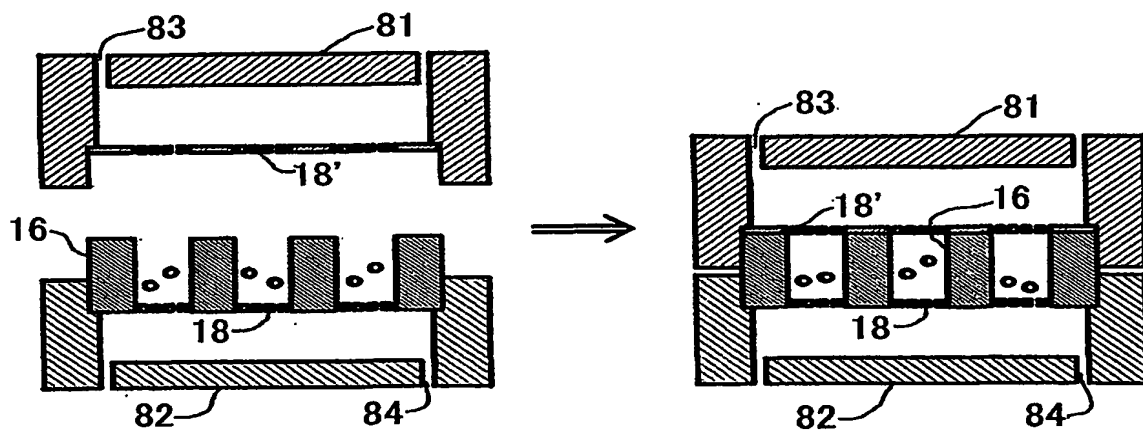
13/27

図 1 4

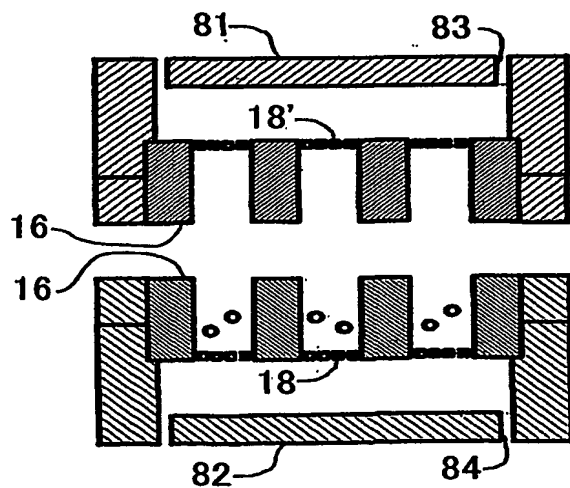
(a)



(b)



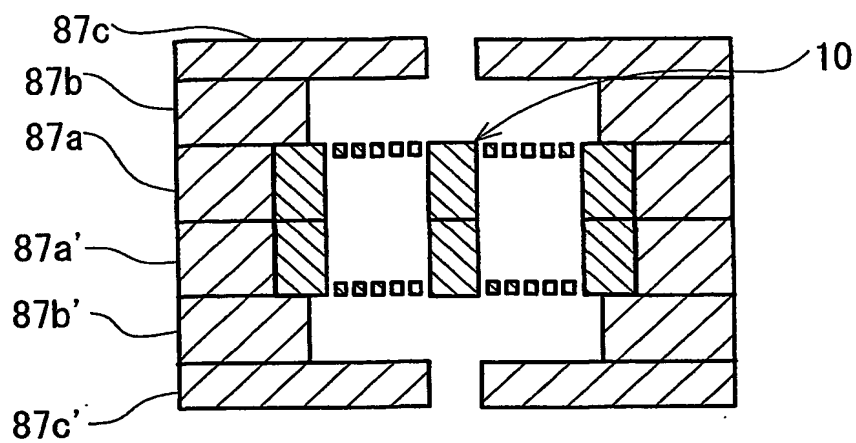
(c)



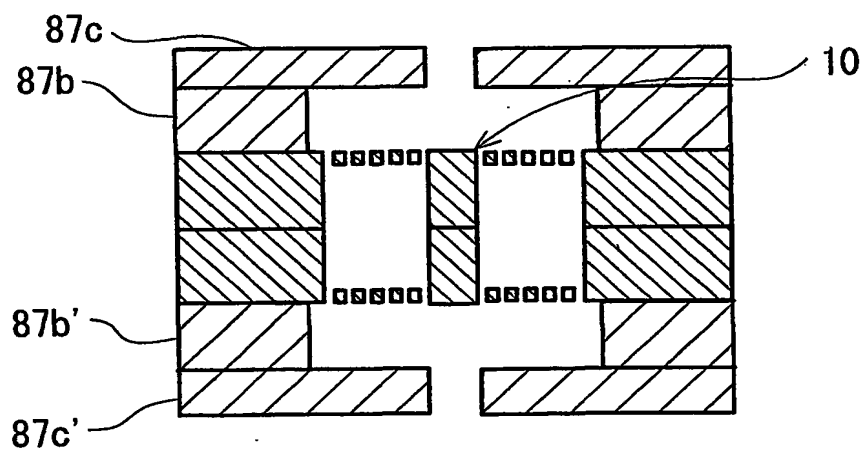
14/27

図 15

(a)



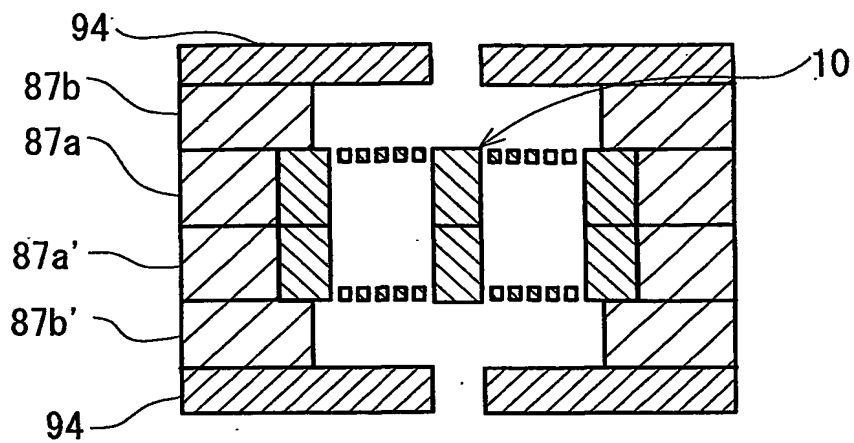
(b)



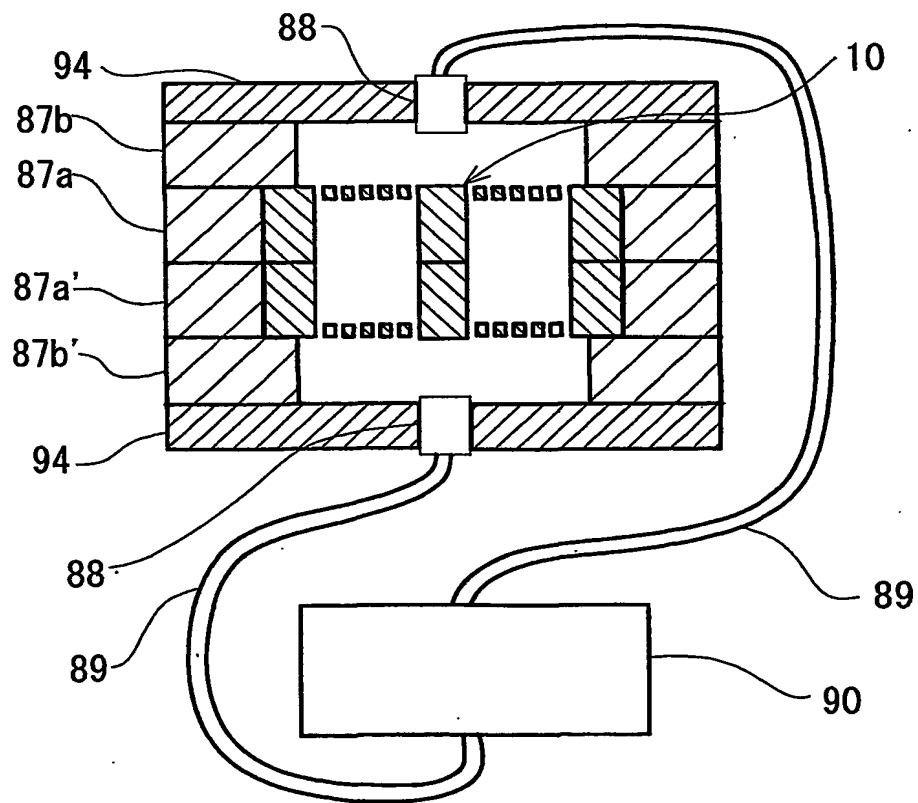
15/27

図 16

(a)

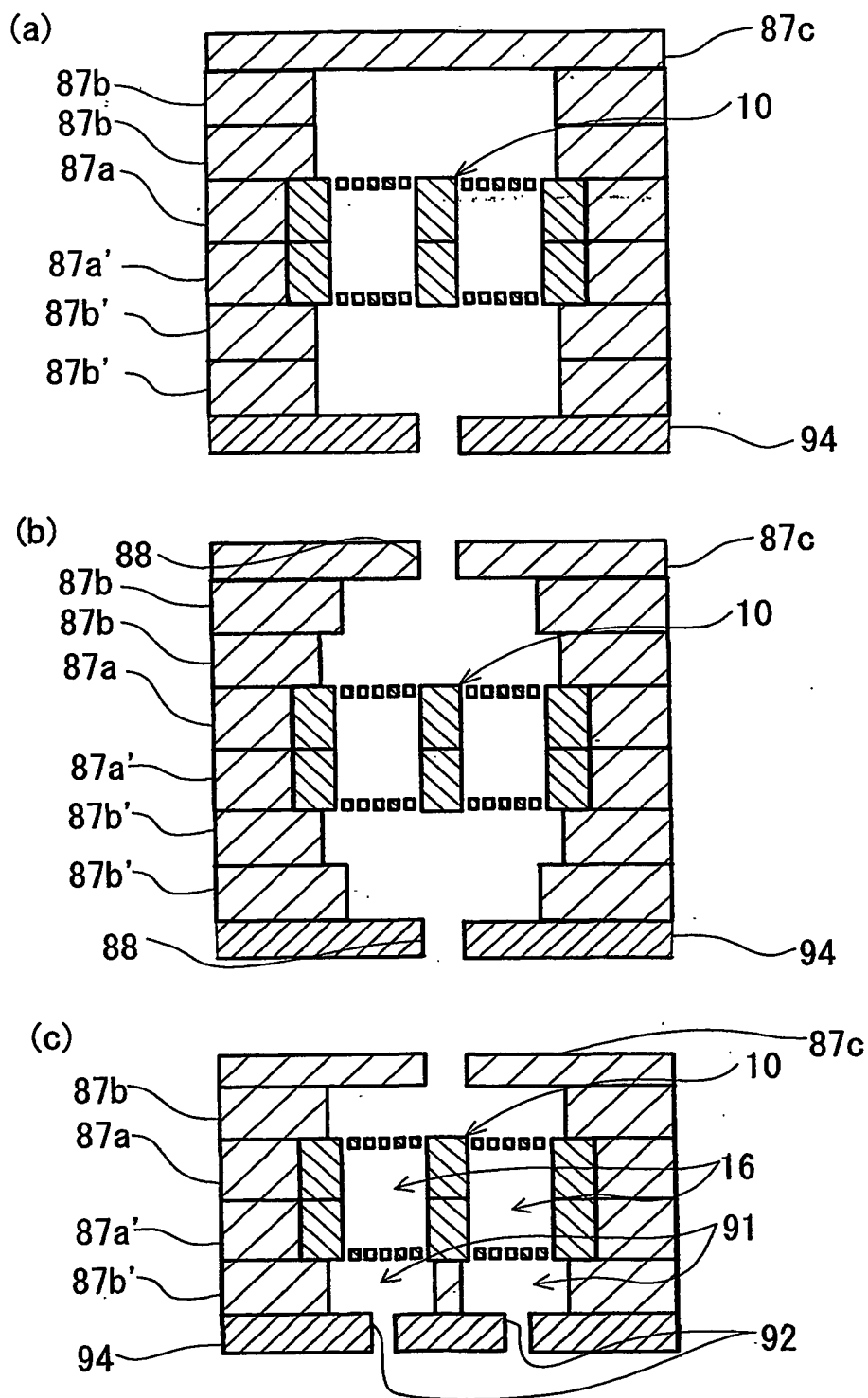


(b)



16/27

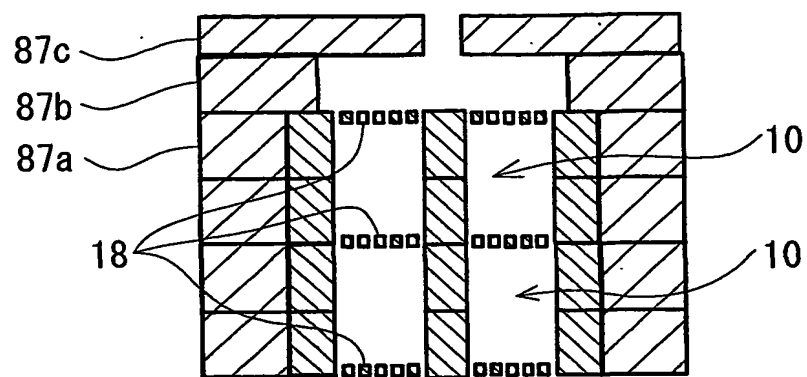
図 17



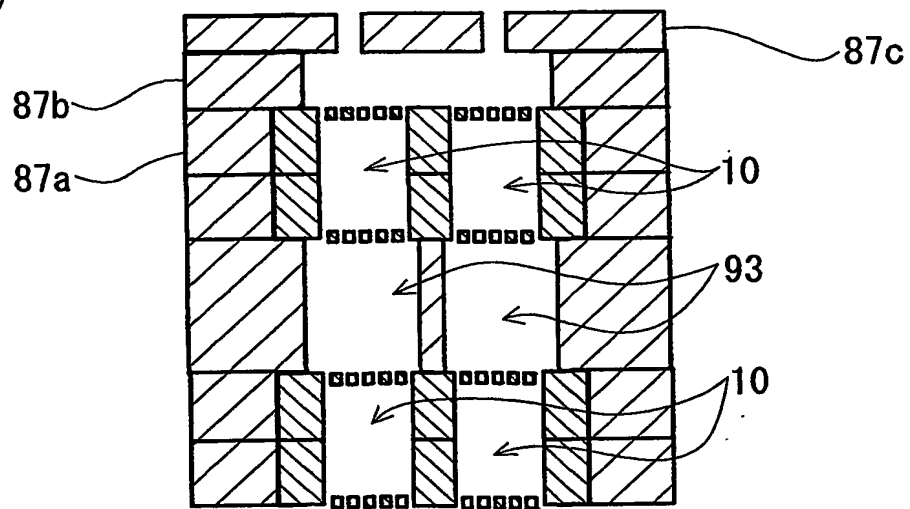
17/27

図 18

(a)

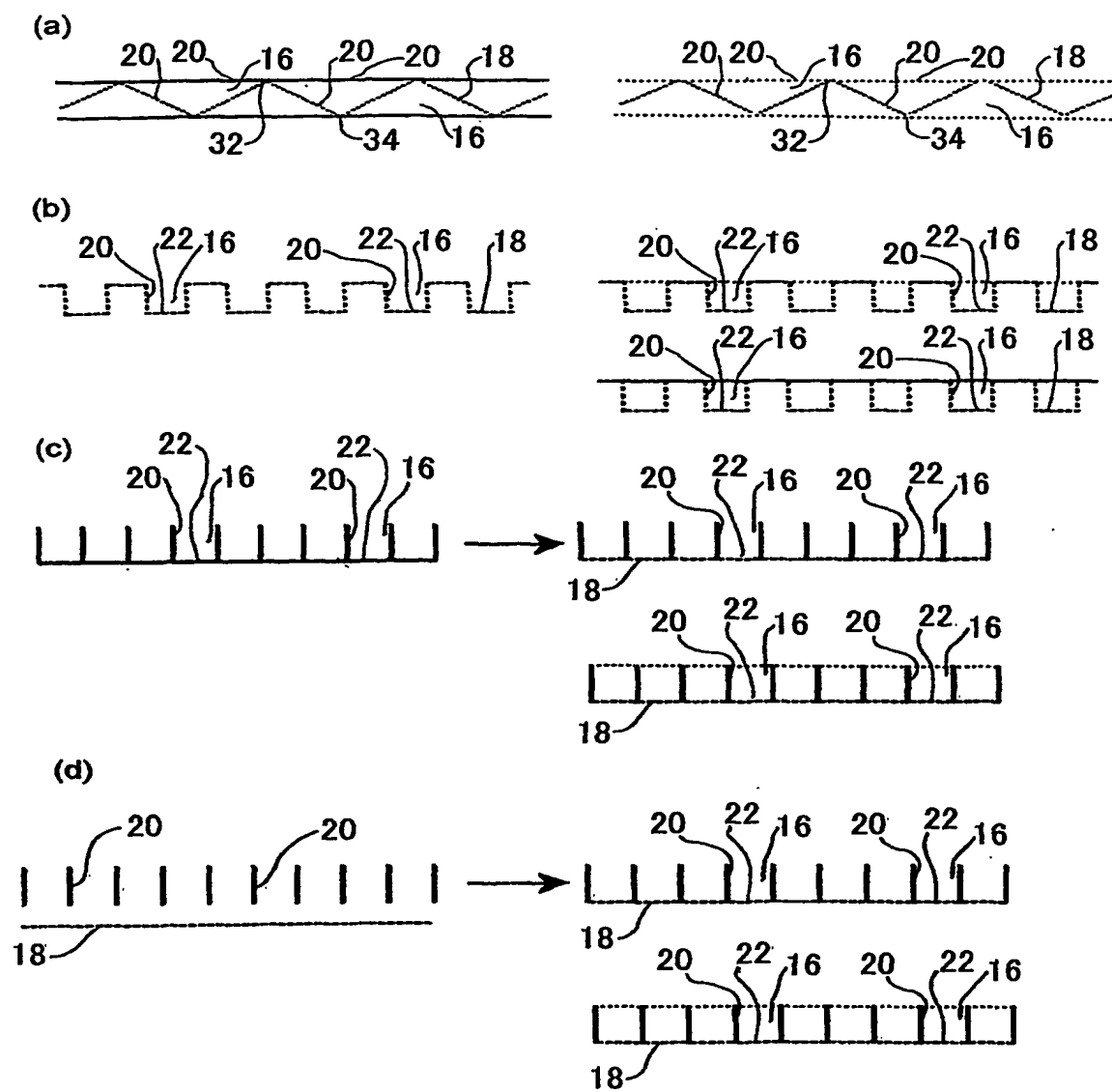


(b)



18/27

図 19



19/27

図 20

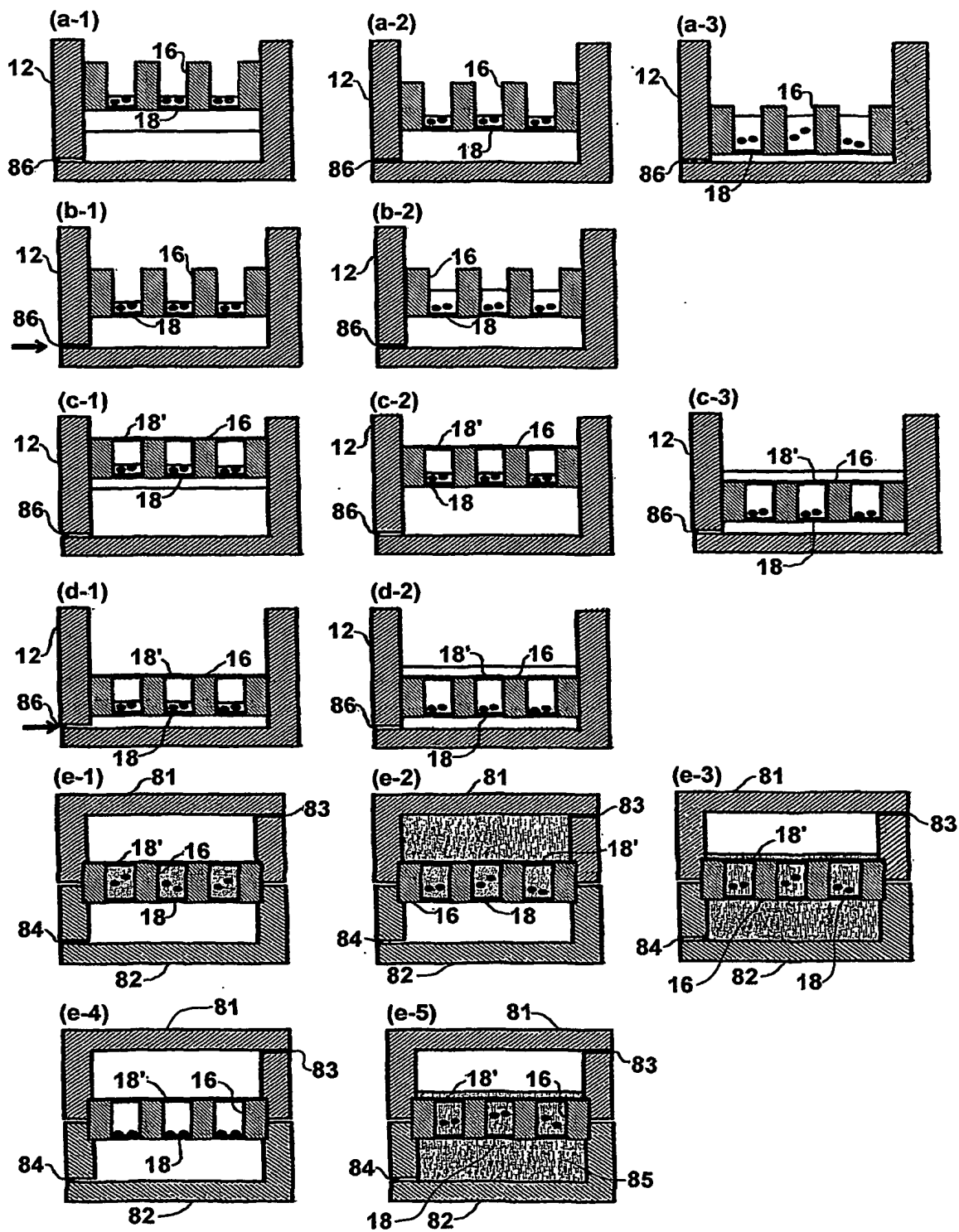
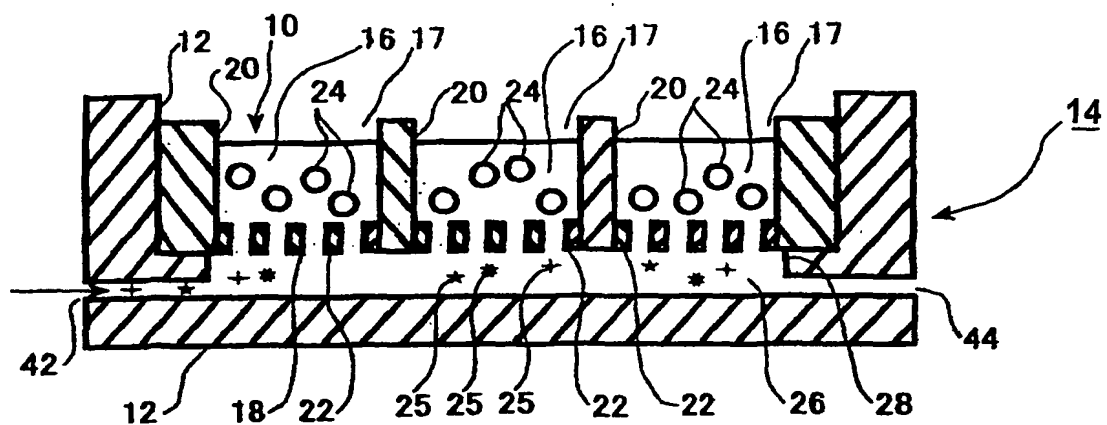
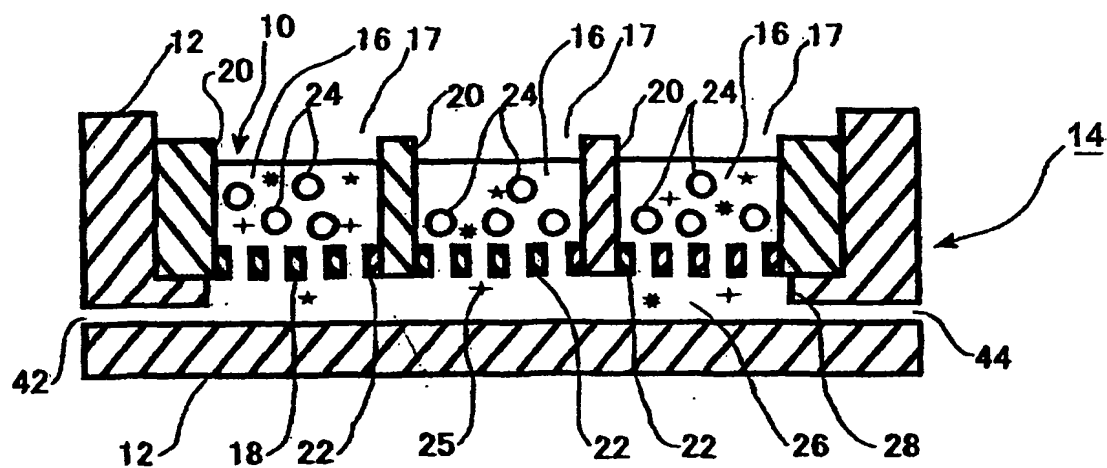


图 21

(a)



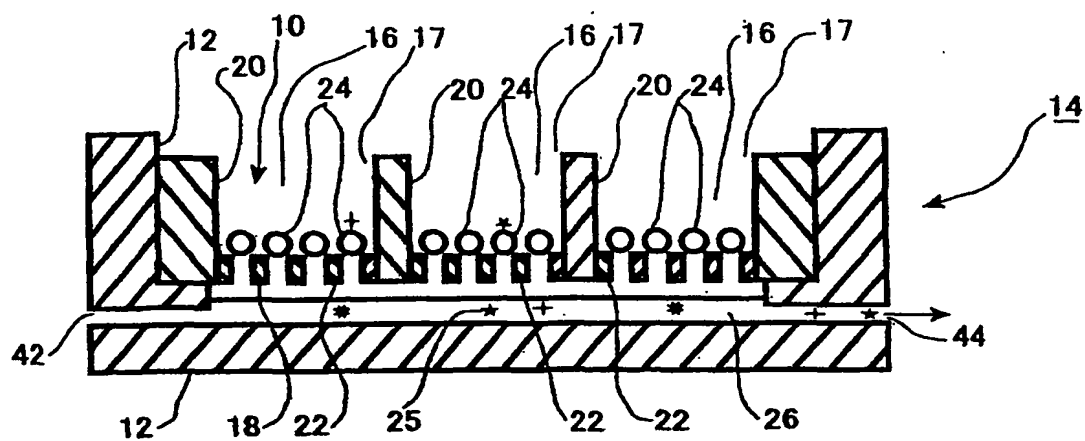
(b)



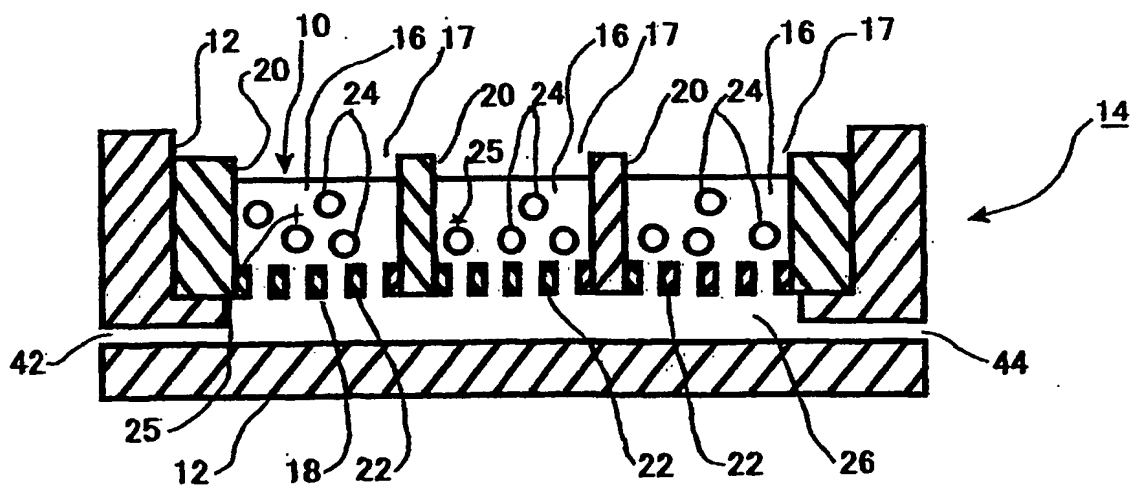
21/27

図 2 2

(a)



(b)



22/27

図 2 3

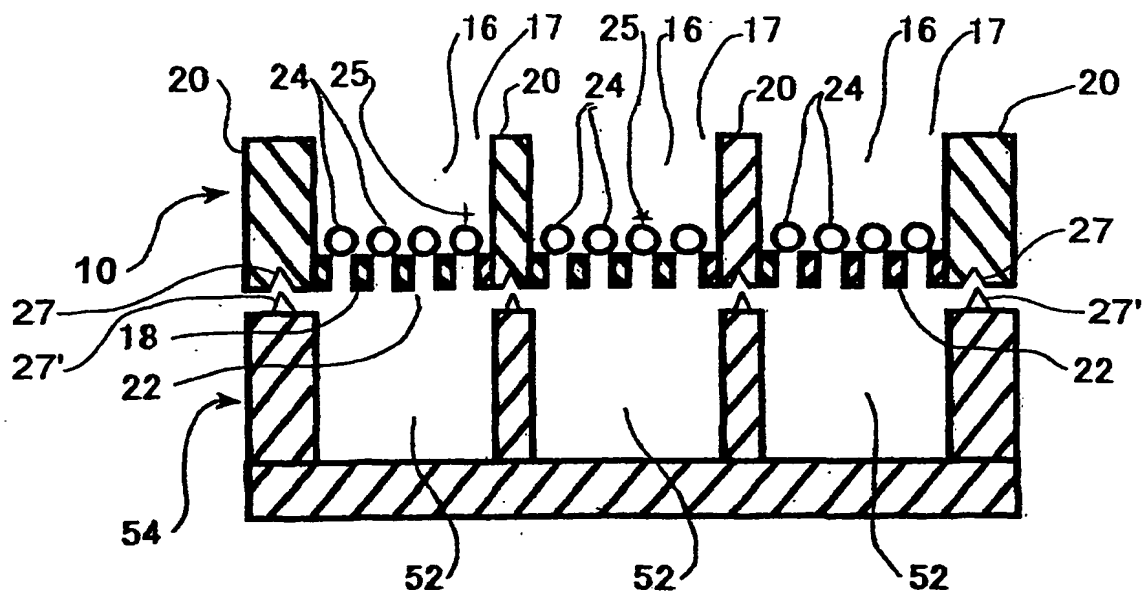
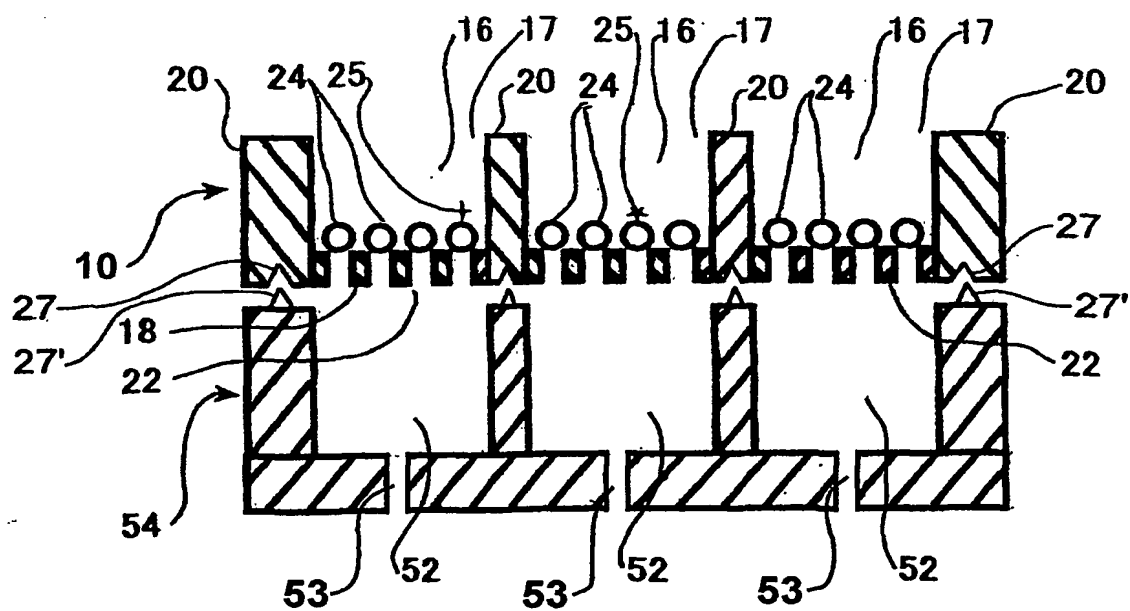
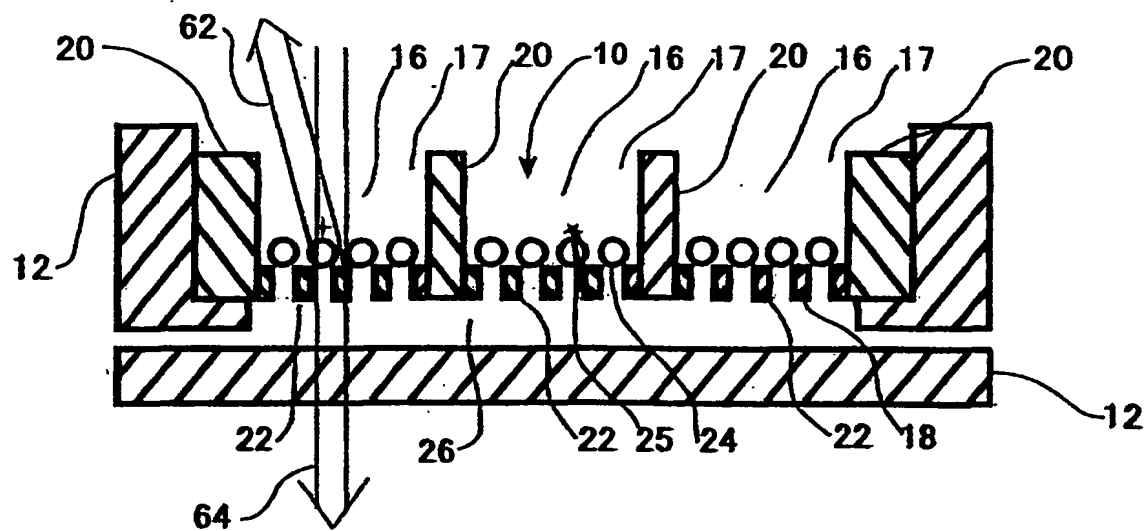


図 2 4



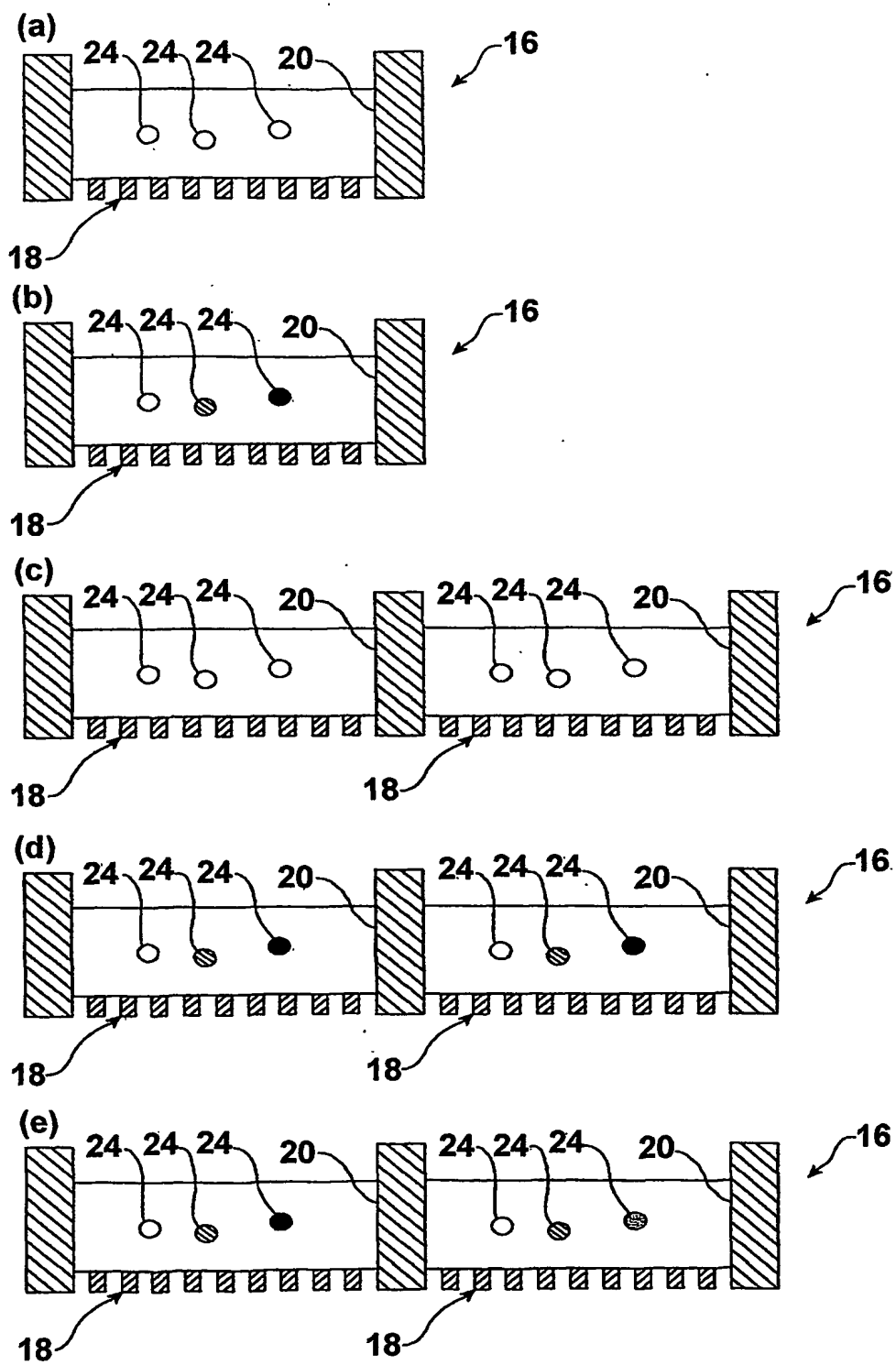
23/27

図 25



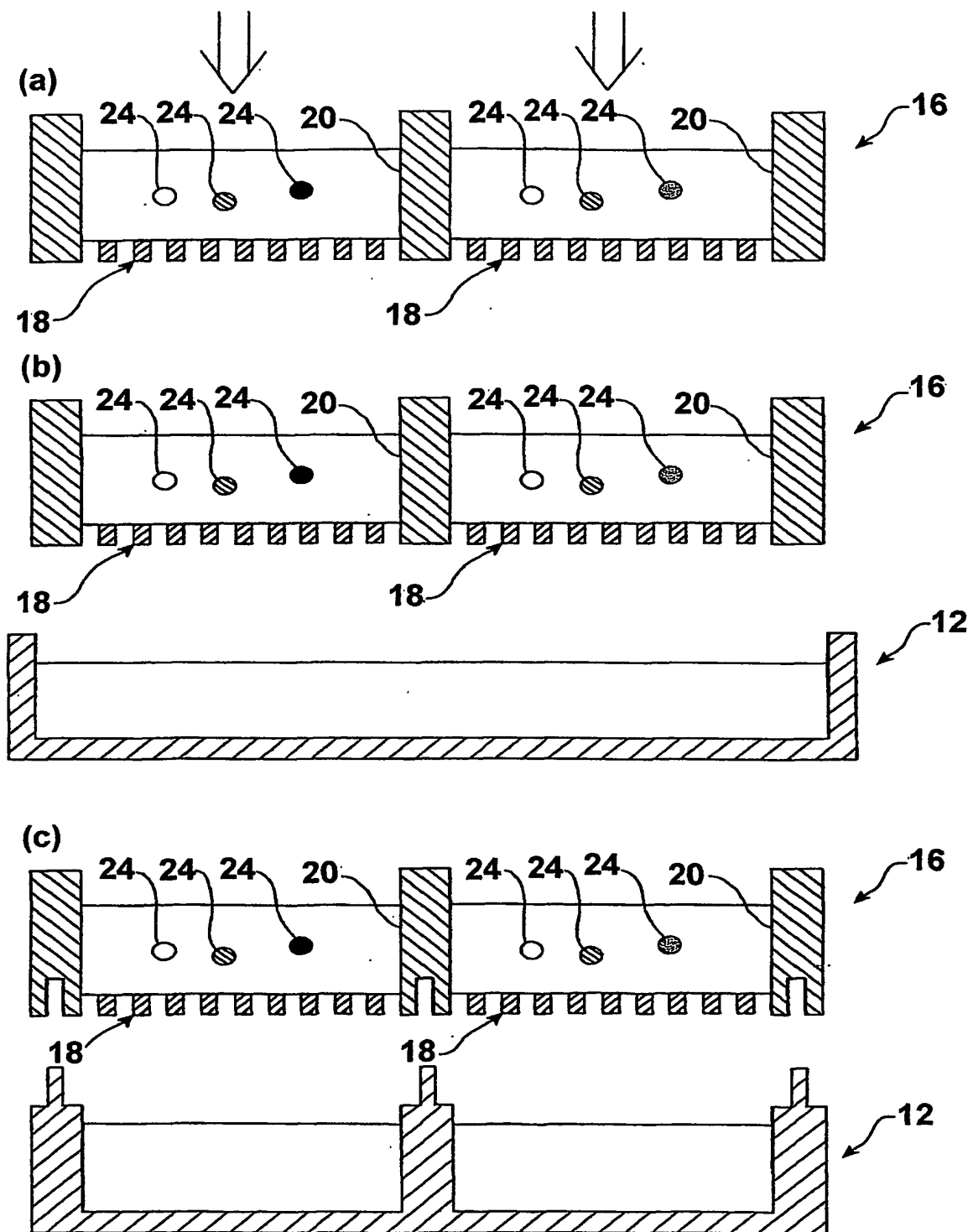
24/27

図 26



25/27

図 27



26/27

図 28

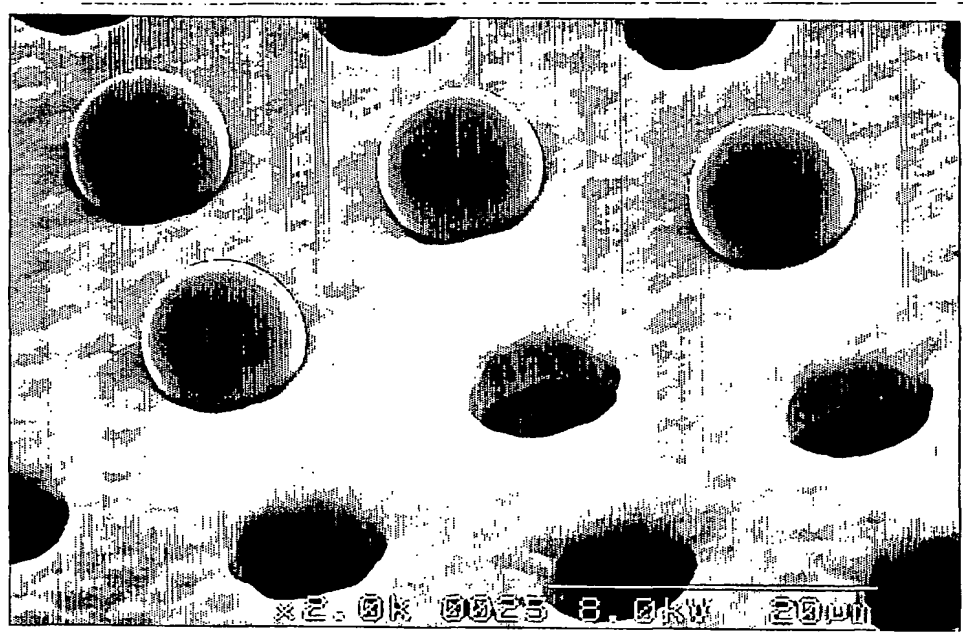
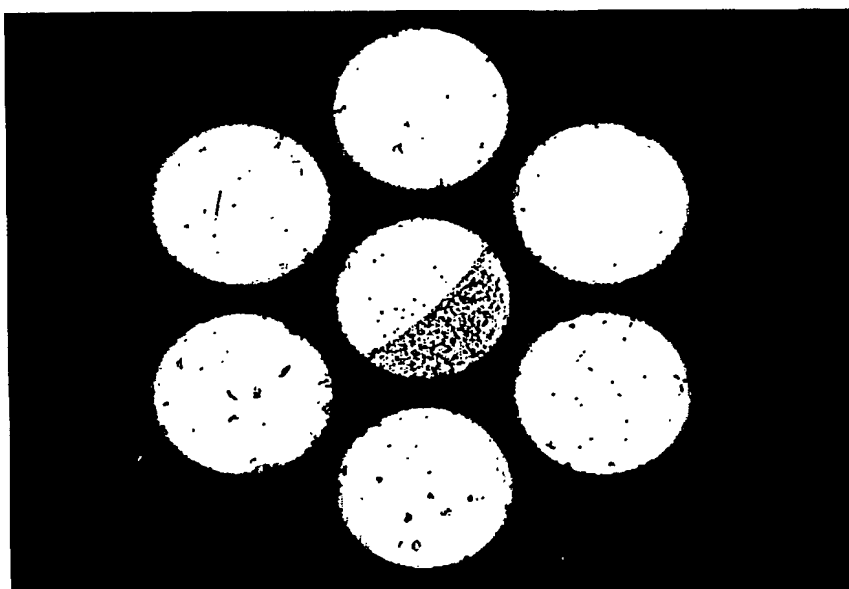


図 29



27/27

図 3 0

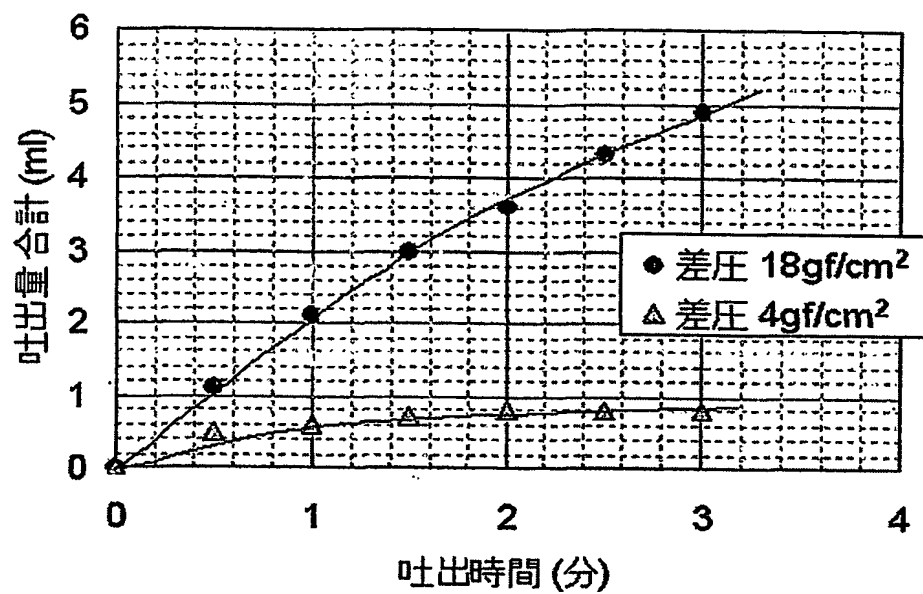
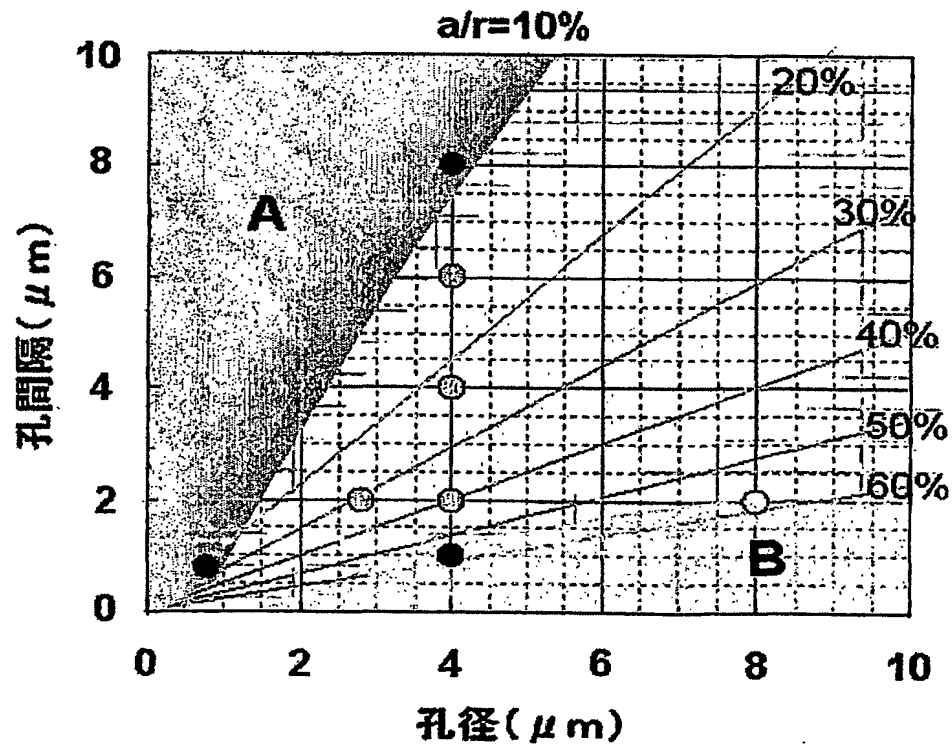


図 3 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-014760 A (Canon Inc.), 15 January, 2003 (15.01.03), & US 2002192600 A	1-46

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 June, 2004 (09.06.04)

Date of mailing of the international search report
22 June, 2004 (22.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-014760 A(キャノン株式会社) 2003.01.15 & US 2002192600 A	1-46

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.06.2004

国際調査報告の発送日

22.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3251